

**Untersuchung von microRNA-Expressionsprofilen in
Abhängigkeit des p53-Mutationsstatus in
Lungenkarzinomzelllinien und primären
Bronchialkarzinomen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Christina Haase
geboren am 15.11.1990 in Leipzig

Gutachter:

1. Frau PD Dr. Yuan Chen, Jena
2. Herr apl. Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhmer, Jena
3. Herr Prof. Dr. Thomas Knösel, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 09.07.2018

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	8
1 Einleitung	10
1.1 Die Molekularpathologie als Schlüssel zur personalisierten Medizin	10
1.2 Das Lungenkarzinom	11
1.2.1 Epidemiologische Betrachtungen	11
1.2.2 Risikofaktoren und Pathogenese	12
1.2.3 Pathologische Aspekte	14
1.2.4 Therapeutische Optionen	17
1.3 Das Tumorsuppressorgen p53	18
1.3.1 Überblick	18
1.3.2 Physiologische Funktion	18
1.3.3 Mutationen des p53-Gens und seiner Regulatoren	20
1.4 microRNAs	22
1.4.1 Einführung	22
1.4.2 Biogenese und Wirkungsweise	22
1.4.3 microRNAs und Onkogenese	24
1.4.4 Die Interaktion zwischen p53 und microRNAs	25
1.4.5 Klinisch-praktische Relevanz der microRNAs	26
2 Ziele der Arbeit	27
3 Material	29
3.1 Laborequipment und Verbrauchsmaterial	29
3.2 Chemikalien und Zellkulturreagenzien	31
3.3 Primer-Sequenzen	32
3.4 Kits und Assays	33
3.5 Lösungen und Puffer	33
4 Methodik	34
4.1 microRNA-Expressionsanalyse an Lungenkarzinomzelllinien	34
4.1.1 Ausgewählte Zelllinien	35
4.1.2 Aussaat und Kultivierung der Zellen in der Monolayer-Zellkultur	37
4.1.3 Ernten von Zellpellets	38
4.1.4 RNA-Isolierung aus Zellen	39
4.1.5 RNA-Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer	40
4.1.6 Reverse Transkription	40

4.1.7 Quantitative Echtzeit-PCR	42
4.1.7.1 <i>Eingesetzte Primer Assays</i>	42
4.1.7.2 <i>Versuchsdurchführung</i>	43
4.1.8 Statistische Auswertung	44
4.2 Analyse der p53-Expression und p53-Zielgenexpression an Lungenkarzinomzelllinien	45
4.2.1 Ausgangsmaterial	46
4.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR	46
4.2.2.1 <i>Verwendete Primer</i>	46
4.2.2.2 <i>Versuchsablauf</i>	46
4.2.3 Statistische Auswertung	47
4.3 p53-Mutations- und microRNA-Expressionsanalyse an primären Lungentumoren ...	47
4.3.1 Ausgewählte Tumorproben	48
4.3.2 p53-Mutationsanalysen	49
4.3.2.1 <i>Ausgangsmaterial</i>	49
4.3.2.2 <i>PCR</i>	49
4.3.2.3 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	50
4.3.2.4 <i>DNA-Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung</i>	50
4.3.2.5 <i>Sanger-Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen</i>	51
4.3.3 microRNA-Expressionsanalyse	52
4.3.3.1 <i>RNA-Isolierung aus Paraffinblöcken</i>	52
4.3.3.2 <i>Reverse Transkription</i>	53
4.3.3.3 <i>Quantitative Echtzeit-PCR</i>	53
4.3.3.4 <i>Statistische Auswertung</i>	53
5 Ergebnisse	54
5.1 microRNA-Expressionsanalyse in Lungenkarzinomzelllinien	54
5.2 Analyse der p53-Expression und p53-Zielgenexpression an Lungenkarzinomzelllinien	57
5.3 p53-Mutationsanalyse an primären Lungentumoren	59
5.4 microRNA-Expressionsanalyse an primären Lungentumoren	63
6 Diskussion	66
6.1 Überblick	66
6.2 microRNA-Expressionsunterschiede im Zellkulturmodell	67
6.3 p53-Expression und p53-Zielgenexpression in Abhängigkeit des Mutationsstatus ...	69
6.4 microRNA-Expressionsunterschiede in primären Lungentumoren	70
6.5 Mögliche Gründe für Diskrepanzen zu anderen Publikationen	71
6.6 Offene Fragen und Ausblick	74

7 Schlussfolgerungen	77
Literatur- und Quellenverzeichnis.....	79
Anhang.....	85
Ethikvotum.....	85
Tabellenverzeichnis	86
Abbildungsverzeichnis	87
Ehrenwörtliche Erklärung.....	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Ago	Argonaut
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ATCC	American Type Culture Collection
BAX	BCL2 associated X
BCL2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CDKN1A	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen 1A (CDK-Inhibitor 1A)
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
circRNA	Zirkuläre RNA (circular RNA)
Ct	Cycle threshold
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal/critical region 8
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
Exp-5	Exportin-5
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (formalin-fixed paraffin-embedded tissue)

G	Guanin
GADD45	Growth arrest and DNA damage-inducible 45
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GOF	Gain of function
HAT	Histon-Acetyltransferase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
miRNA	microRNA
mRNA	Messenger RNA
ncRNA	Nicht-codierende RNA
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer)
NSCLC-NOS	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, nicht sicher subzuklassifizieren (non-small cell lung cancer not otherwise specified)
nts	Anzahl der Nukleotide (number of nucleotides)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCA3	Prostate cancer antigen 3
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor A
Pol	Polymerase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis

Ran-GTP	Ran-Guanosintriphosphat (Ras-related nuclear protein GTP)
Rb	Retinoblastom
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RS5	Relatives 5-Jahres-Überleben
RT	Reverse Transkription
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom (small cell lung cancer)
SE	Standardfehler des Mittelwertes (standard error)
SIRT1	Silent Information Regulator 1
snRNA	Kleine nukleäre Ribonukleinsäure (small nuclear ribonucleic acid)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β (transforming growth factor β)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
U	Uracil
UICC	Union internationale contre le cancer
UTR	Untranslatierter Bereich/untranslatierte Region (untranslated region)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

ZUSAMMENFASSUNG

Das Lungenkarzinom zählt mit rund 53.500 Neuerkrankungen im Jahr 2013 zu den häufigsten malignen Neoplasien in Deutschland. Die Prognose des Bronchialkarzinoms ist trotz verbesserter, individualisierter Therapiekonzepte und Fortschritten in der Diagnostik oftmals infaust. Mit einem Anteil von 11,5 % bei Frauen bzw. 20 % bei Männern an den Krankheitskosten für alle bösartigen Neubildungen ergibt sich zudem eine hohe Belastung für das Gesundheitssystem. Mehr als die Hälfte aller Bronchialkarzinome weisen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 auf. Infolge seiner enormen Bedeutung für die Onkogenese ist das Interesse an der Erforschung der Regulationsmechanismen und -störungen des p53-Gens weiterhin ungebrochen. Mit der Entdeckung der microRNAs wurde das komplexe regulatorische Netzwerk um den Tumorsuppressor p53 durch unzählige Einflussnehmer erweitert. Diese Gruppe nichtcodierender Ribonukleinsäuren entfaltet ihre Wirkung über die Bindung an die 3'-untranslatierte Region der jeweiligen Ziel-mRNA. Als Kontrolleure der Genexpression sind sie an der Steuerung zahlreicher physiologischer Funktionen beteiligt, besitzen jedoch auch einen Anteil an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, einschließlich der Bildung maligner Tumoren. Über die Entwicklung tumortypischer microRNA-Expressionsmuster erhofft man sich einen diagnostischen und prognostischen Nutzen.

Inhalt dieser experimentellen Arbeit war die Analyse der Interaktion zwischen 11 ausgewählten microRNAs und dem Tumorsuppressorgen p53 in Lungenkarzinomzelllinien und Proben primärer Bronchialkarzinome. Nach der Isolierung von RNA aus den Zellen bzw. Gewebeproben wurde die Reverse Transkription und anschließend die quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung der microRNA-Expressionslevel durchgeführt. Die Patientenproben wurden zudem mittels Sanger-Sequenzierung auf Mutationen des p53-Gens untersucht. Im Zellkulturmodell erfolgte ferner die Bestimmung der p53-Expression und p53-Zielgenexpression. Ziel war die Klärung der Fragestellung, ob relevante Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Zelllinien bzw. Gewebeproben feststellbar sind. Idealerweise sollte so ein Beitrag zum besseren Verständnis der an der Onkogenese beteiligten Prozesse geleistet werden.

Die Mutationsanalyse ergab in Übereinstimmung mit anderen publizierten Forschungsdaten in 11 von 29 Fällen (37,9 %) Mutationen des p53-Gens, davon konnten 4 in den besonders häufig veränderten „Hotspot“-Bereichen (R249, R273) des Gens nachgewiesen werden. Bei den übrigen 18 Patientenproben (62,1 %) lag das Tumorsuppressorgen in der Wildtyp-Form vor.

Die statistische Auswertung der PCR-Daten ergab weder für das Zellkulturmodell, noch für die Gewebeproben signifikante microRNA-Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Gruppen. Auch die Analyse der p53-Expression und p53-Zielgenexpression an den Zelllinien lieferte keine signifikanten Abweichungen zwischen Wildtyp- und Mutanten-Gruppe.

Die Regulation der Expression der untersuchten microRNAs durch p53 scheint in Lungenkarzinomzelllinien und primären Bronchialkarzinomen unabhängig von Mutationen des Tumorsuppressorgens zu sein. Eine unterschiedliche Beeinflussung der Expression von p53 und seiner Zielgene durch microRNAs je nach Mutationsstatus konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Vor dem Hintergrund abweichender Ergebnisse und Diskrepanzen zu anderen Publikationen empfiehlt sich die Durchführung weiterer Experimente mit größerem Stichprobenumfang zur Validierung der erhobenen Daten.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Molekularpathologie als Schlüssel zur personalisierten Medizin

*„Es ist, wie ich schon erwähnte, notwendig, dass unsere Anschauungen um ebenso viel vorrücken, als sich unsere Sehfähigkeit durch das Mikroskop erweitert hat:
Die gesamte Medizin muss den natürlichen Vorgängen mindestens
um 300-mal näher treten.“*

(Virchow 1847)

Mit diesen Worten bricht Rudolf Virchow, deutscher Arzt, Anthropologe, Historiker und Politiker, im Jahr 1847 mit einer bis dato weit verbreiteten Ansicht: dass das Mikroskop lediglich als diagnostisches Hilfsmittel in der Medizin dienen kann. Virchow hingegen erkennt dessen enorme Bedeutung für die Erklärung und Erforschung von Erkrankungen und den ihnen zugrunde liegenden Pathomechanismen. Rund zehn Jahre später veröffentlicht er sein Buch „Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre“. Der darin beschriebene zentrale Grundsatz, dass Krankheiten auf Störungen der Körperzellen zurückzuführen sind, läutet ein neues Zeitalter der Medizin ein und löst die seit der Antike bestehende Theorie der Vier-Säfte-Lehre ab. Gleichzeitig sollte Virchows „Cellularpathologie“ aus dem Jahr 1858 das Fundament für ein Teilgebiet der Medizin werden, das sich nicht nur der Beschreibung und Diagnostik krankhafter Veränderungen widmet, sondern auch deren Ätiologie, Pathogenese und Folgen zu erklären und erforschen versucht. Seit Einführung der mikroskopischen Untersuchung von Zellen und Geweben hat es zahlreiche Meilensteine und Weiterentwicklungen gegeben, die das Methodenspektrum der heutigen modernen Pathologie repräsentieren: von der Elektronenmikroskopie über die Immunhistochemie, bis hin zur jüngsten Entwicklung, der Molekularpathologie. (Dhom 2001)

Insbesondere die pathologische Tumordiagnostik stützt sich zunehmend auf eine Kombination aus traditioneller Histopathologie und molekularen Analysen von Zellen und Geweben. Während molekulare Untersuchungen mit ihrem Aufkommen in den späten 1990er Jahren vorrangig der korrekten Klassifizierung und Diagnostik von Tumoren dienten, sind es heutzutage insbesondere therapeutische Entscheidungen, die auf der Grundlage molekularpathologischer Testergebnisse getroffen werden.

Durch die Entwicklung neuer Medikamente, die auf krebstypische molekulare Veränderungen abzielen oder als Inhibitoren aktivierter, tumorspezifischer Pathways fungieren, ist die genaue Charakterisierung des Tumors auf molekularer Ebene essenziell. So stützt sich beispielsweise die Therapie des Mammakarzinoms mit dem Antikörper Trastuzumab auf den Nachweis einer HER2-Überexpression. Bei Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) sind es hingegen aktivierende Mutationen des KIT- und PDGFRA-Gens, die den Patienten für eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) qualifizieren. Zur Untersuchung solcher Veränderungen kann der Molekularpathologe auf eine Vielzahl unterschiedlicher Verfahren und Methoden zurückgreifen. Die mit Abstand größte Bedeutung kommt hierbei jedoch der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit ihren zahlreichen Abwandlungen und Variationen zu. (Dubbink et al. 2014)

Durch das ungebrochene Interesse an der Erforschung neuer molekularer Angriffspunkte für eine gezielte Krebstherapie und die Entwicklung innovativer Medikamente wird die Molekularpathologie auch in Zukunft von entscheidender Bedeutung sein. Gleichzeitig leistet sie einen unentbehrlichen Beitrag zur Realisierung individuell angepasster Therapiekonzepte und stellt somit eine zentrale Säule der personalisierten, patientenzentrierten Medizin dar.

1.2 Das Lungenkarzinom

1.2.1 Epidemiologische Betrachtungen

Tumoren der Lunge zählen zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Nach Informationen der Weltgesundheitsorganisation ist jeder fünfte krebsbedingte Todesfall auf das Lungenkarzinom zurückzuführen, rund 1,6 Millionen Menschen starben im Jahr 2012 an den Folgen einer malignen Neoplasie der Lunge (Ferlay et al. 2013).

Auch in Deutschland gehört das Bronchialkarzinom mit rund 53.500 Neuerkrankungen im Jahr 2013 zu den häufigsten Krebsarten. Die Mortalität lag im gleichen Jahr mit etwa 30.000 Sterbefällen bei Männern knapp doppelt so hoch wie bei Frauen. Infolge der demografischen Entwicklung und der steigenden Erkrankungsraten bei Frauen, die im Wesentlichen auf die kontinuierliche Zunahme des Tabakkonsums

zurückzuführen sind, wird bis zum Jahr 2020 weiterhin ein Anstieg der Erkrankungsfälle prognostiziert. (Zentrum für Krebsregisterdaten 2016)

Die Mortalität ist bei Patienten mit Tumoren der Lunge hoch. Das durchschnittliche relative 5-Jahres-Überleben (RS5) nach Diagnosestellung lag in der Periode 2011 bis 2013 für Frauen bei 20,8 % und für Männer bei 16,1 %. Dabei bestehen erhebliche Unterschiede im Überleben mit Lungenkrebs je nach Differenzierungsgrad der Tumoren und histologischem Typ: Gut differenzierte neuroendokrine Tumoren, die allerdings nur etwa 1 % aller Lungentumoren ausmachen, weisen mit einem RS5 über 75 % eine sehr gute Prognose auf, während Patienten mit kleinzelligen Karzinomen das niedrigste RS5 von deutlich unter 10 % zeigen. Gleichwohl ist Lungenkrebs bei Männern die bösartige Neubildung mit den meisten verlorenen Lebensjahren und den meisten Todesfällen. Bei Frauen bilden Bronchialkarzinome die Diagnose mit den zweithäufigsten Todesfällen und verlorenen Lebensjahren. (Zentrum für Krebsregisterdaten 2016)

1.2.2 Risikofaktoren und Pathogenese

Die überwiegende Mehrzahl der Bronchialkarzinome ist auf die karzinogene Wirkung von Bestandteilen des Zigarettenrauches zurückzuführen, mit einer nahezu linearen Korrelation zwischen der Häufigkeit von Lungentumoren und der Nikotindosis. Daneben spielt auch die berufliche Exposition unter anderem gegenüber Arsen, Beryllium, Cadmium, Chrom oder Nickel eine Rolle bei der Karzinogenese (Berufskrankheiten-Verordnung 1997). Weitere exogene Faktoren wie Feinstaub, Asbest, Quarzstäube oder Dieselmotorabgase gelten ebenfalls als gesicherte Risikofaktoren.

Auf der Basis der Akkumulation genetischer Treibermutationen vollzieht sich die neoplastische Transformation der pulmonalen Epithelzellen als komplexer, mehrstufiger Prozess (Abbildung 1). Die Entstehung des Lungenkarzinoms wird durch die Aktivierung von Onkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen initiiert, die zu unkontrollierter Replikation und zum Wachstum maligner Zellen führen. Dabei zeigen sich zum Teil deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Art genetischer Veränderungen zwischen den einzelnen histologischen Subtypen.

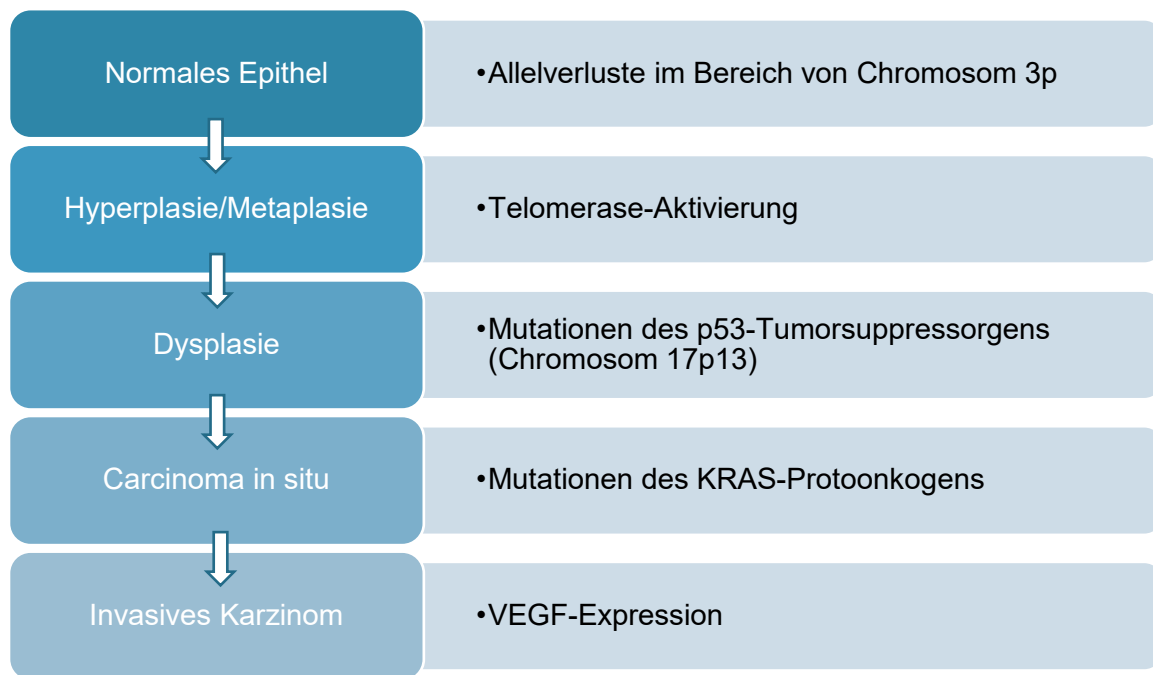


Abbildung 1: Akkumulation genetischer Veränderungen im Verlauf der Tumorentstehung. Die Anhäufung der Alterationen, vielfach ausgelöst durch die karzinogene Wirkung von Bestandteilen des Zigarettenrauches, führt zur Transformation des normalen Bronchialepithels über hyperplastische, metaplastische und dysplastische Läsionen zum Carcinoma in situ und schließlich zum invasiven Karzinom. (Nach Osada und Takahashi 2002)

So weisen Plattenepithelkarzinome typischerweise Deletionen im Bereich von Genen auf, die für Tumorsuppressoren kodieren, insbesondere auf Chromosom 17, wo unter anderem das p53-Gen lokalisiert ist. Auch kleinzellige Tumoren der Lunge fallen in 75 bis 90 % der Fälle durch Mutationen des p53-Gens auf. Sie zeichnen sich zudem durch eine hohe Rate an Alterationen des Rb-Gens aus, mit dem Resultat einer abnormen oder völlig fehlenden Expression des Rb-Proteins. Eine häufige Veränderung sowohl kleinzelliger, als auch nicht-kleinzelliger Tumoren der Lunge stellen Verluste von Allelen im Bereich des kurzen Armes des Chromosoms 3 dar. Diese Aberrationen lassen sich bereits in histologisch unauffälligem Gewebe gesunder Raucher nachweisen, was den Schluss nahelegt, dass in dieser Region Tumorsuppressorgene lokalisiert sind, die die Karzinogenese einleiten. Die seltener mit dem Risikofaktor Rauchen assoziierten Adenokarzinome hingegen sind vorwiegend mit Veränderungen verbunden, die Rezeptortyrosinkinasen betreffen, unter anderem finden sich Mutationen im EGFR- oder ALK-Gen. Besonders Mitglieder der EGFR-Familie spielen durch ihre Modulation von Prozessen wie Zellproliferation, Apoptose oder Neovaskularisation eine entscheidende Rolle bei der Karzinomentstehung.

Charakteristisch für Adenokarzinome sind ferner Mutationen des KRAS-Protoonkogens, die typischerweise das Codon 12 betreffen und eine starke Assoziation zu einer verkürzten Überlebenszeit chirurgisch behandelter Patienten aufweisen. Ein entscheidender Prozess bei der Tumorentstehung stellt die Angiogenese dar, die durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert wird. Etwa 50 % aller Lungenkarzinome zeigen folglich eine übermäßige Expression von VEGF, die mit einer erhöhten Gefäßdichte einhergeht. Die häufig in Bronchialkarzinomen beobachtete Aktivierung der Telomerase befördert außerdem die Immortalität der Tumorzellen und korreliert mit Zellproliferation und Progression in nicht-kleinzelligen Lungentumoren. (Osada und Takahashi 2002, Cheng et al. 2012)

Verschiedene Typen epithelialer Vorläuferläsionen des invasiven Karzinoms sind bekannt: die plattenepitheliale Dysplasie und das plattenepitheliale Carcinoma in situ, die atypische adenomatöse Hyperplasie, das Adenocarcinoma in situ und die diffuse idiopathische pulmonale neuroendokrine Zellhyperplasie (Travis et al. 2015).

1.2.3 Pathologische Aspekte

Die Diagnose des Lungenkarzinoms, also eines primär in der Lunge entstandenen epithelialen Malignoms, kann durch den Pathologen auf der Grundlage histologischer oder zytologischer Untersuchungen gestellt werden. Gemäß der aktuellen Klassifikation nach WHO/IARC werden folgende Haupttypen unterschieden: das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom sowie die neuroendokrinen Tumoren, einschließlich der kleinzelligen und großzelligen Karzinome (Travis et al. 2015). Jede dieser Formen kann nochmals in diverse Subtypen klassifiziert werden. Die historische Unterteilung in kleinzellige (SCLC) und nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC) wird zunehmend verlassen, da vor dem Hintergrund der unterschiedlichen klinischen Präsentation, Metastasierung und dem ungleichen Therapieansprechen eine möglichst präzise Klassifizierung obligat ist. Insbesondere die Auswahl einer therapeutischen Strategie ist maßgeblich von der vorliegenden Histologie und dem Ergebnis molekularpathologischer Untersuchungen abhängig. Beispielsweise profitieren Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge, das eine Mutation des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) aufweist, von der medikamentösen

Behandlung mit EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs). Sie kommen ebenfalls für Pemetrexed- oder Bevacizumab-gestützte Therapieschemata in Betracht, während Patienten mit der Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms für diese Regime nicht geeignet sind. (Travis 2011)

Das Plattenepithelkarzinom der Lunge zeichnet sich histologisch typischerweise durch Interzellularbrücken und eine zum Teil ausgeprägte Verhornungstendenz aus. In schlecht differenzierten Tumoren können diese Veränderungen schwer nachweisbar sein. Zu den Subtypen zählen unter anderem papilläre, klarzellige und basaloide Formen. (Travis 2011)

Adenokarzinome, die sich im Gegensatz zu den anderen Formen des Lungenkarzinoms durch eine weniger starke Assoziation zum Risikofaktor Tabak auszeichnen und dementsprechend das typische Karzinom des Nicht-Rauchers sind, zeigten zuletzt steigende Inzidenzen (Zentrum für Krebsregisterdaten 2016). Das invasive muzinöse Adenokarzinom weist im Gegensatz zu den nicht-muzinösen Varianten häufig Mutationen des KRAS-Gens sowie einen Mangel an TTF-1 (thyroid transcription factor 1) auf. Zu den typischen histologischen Wachstumsmustern dieser glandulär differenzierten Tumoren zählen unter anderem lepidische, azinäre, papilläre oder mikropapilläre Formen. (Travis 2011)

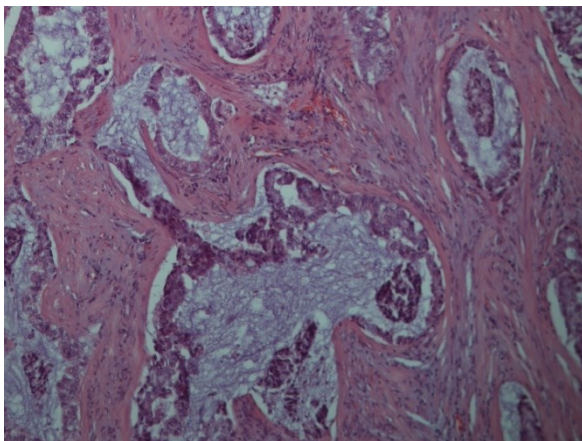


Abbildung 2: Adenokarzinom,
HE-Schnitt, 200fache Vergrößerung

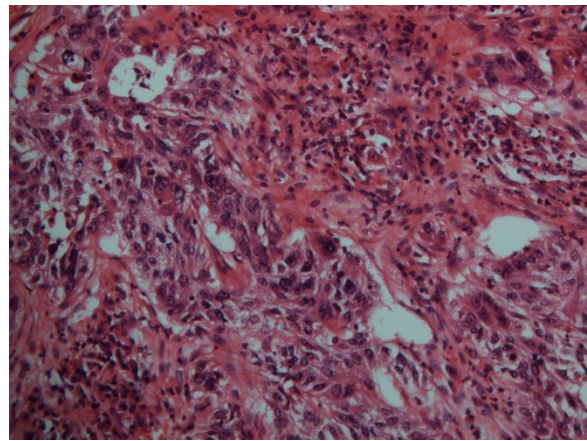


Abbildung 3: Plattenepithelkarzinom,
HE-Schnitt, 200fache Vergrößerung

Da 70 % der Lungentumoren erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt werden und häufig bereits nicht mehr resezierbar sind, kommt der Beurteilung zytologischer und biopischer Proben eine besondere Bedeutung zu. Von immenser Wichtigkeit ist die korrekte Unterscheidung zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinom, da von dieser Diagnose wesentliche Therapieentscheidungen abhängen. Patienten mit einem fortgeschrittenen Adenokarzinom der Lunge sollten auf eine Mutation des EGF-Rezeptors untersucht werden und bei positivem Testergebnis eine Behandlung mit einem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor erhalten. Hierdurch können unter anderem die Remissionsraten und das progressionsfreie Überleben verbessert werden. Auch die Entscheidung, ob ein Pemetrexed-haltiges Therapieschema gewählt wird, stützt sich im Wesentlichen auf die Histologie. Während Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge hierauf gut ansprechen, zeigen Patienten mit einem plattenepithelialen Tumor zum Teil lebensgefährliche Komplikationen, wie Hämorrhagien. (Johnson et al. 2004)

Bei Tumoren ohne eindeutige plattenepitheliale oder glanduläre Differenzierung (NSCLC-NOS) wird ein minimales immunhistochemisches Programm mit einem Adenokarzinom- und einem Plattenepithelkarzinom-Marker empfohlen. Hierfür eignen sich insbesondere TTF-1 und p63. (Travis 2011)

Kleinzellige Karzinome machen rund 14 % aller Lungentumoren aus und fallen durch markante histologische Merkmale auf. Die Tumorzellen sind klein und rund oder oval, mit wenig Zytoplasma und fein granuliertem Kernchromatin (Salz-und-Pfeffer-Struktur), sowie fehlenden oder unauffälligen Nukleolen. Zum Teil fallen ausgeprägte Nekrosen auf, die Mitoserate ist typischerweise hoch. (Travis 2011)

Die Ausschlussdiagnose des großzelligen Lungenkarzinoms wird beim Fehlen eindeutig plattenepithelialer, kleinzelliger oder drüsiger Differenzierung gestellt. Charakteristisch sind große polygonale Zellen mit vesikulären Zellkernen und prominenten Nukleolen. Die Diagnose nur auf der Grundlage einer Biopsie oder rein zytologischen Untersuchung zu stellen, ist hierbei nicht möglich, da das Vorhandensein einer plattenepithelialen oder drüsig differenzierten Komponente nicht sicher ausgeschlossen werden kann. (Travis 2011)

1.2.4 Therapeutische Optionen

Für die Auswahl einer geeigneten Therapie ist zunächst maßgeblich, ob es sich um ein kleinzelliges Karzinom oder eine andere Tumorentität handelt.

Die Therapieempfehlungen für das kleinzellige Bronchialkarzinom orientieren sich an der Stadieneinteilung in Very Limited, Limited und Extensive Disease. Im Zentrum der Behandlung steht beim kleinzelligen Karzinom dabei die medikamentöse Tumorthherapie (Chemotherapie). Aus der Kombination mit operativer Resektion oder Radiotherapie ergibt sich für die Limited Disease ein kurativer, für die Extensive Disease ein palliativer Anspruch. Für die adjuvante Chemotherapie wird dabei in der Regel eine platinhaltige Kombinationstherapie durchgeführt, bestehend aus Cis- oder Carboplatin und Etoposid oder Irinotecan bzw. Topotecan. (Goeckenjan et al. 2010 und Früh et al. 2013)

Die Behandlung der nicht-kleinzelligen Tumoren erfolgt ebenfalls stadienabhängig. Wichtige Faktoren neben der Stadieneinteilung nach TNM und UICC 8 sind Allgemeinzustand, Lungenfunktion und Komorbiditäten des Patienten. Die verschiedenen therapeutischen Optionen werden dabei im Rahmen interdisziplinärer Tumorkonferenzen abgewogen. Bis zum Stadium IIIA ist die operative Entfernung des Tumors, gefolgt von einer stereotaktischen Bestrahlung (Stadium IA) bzw. adjuvanten Chemotherapie (ab Stadium IB), die Vorgehensweise der Wahl. In höheren Tumorstadien hat sich hingegen die kombinierte Radiochemotherapie bewährt. Die Auswahl geeigneter Substanzen richtet sich nach histologischer Klassifikation und molekularpathologischen Alterationen. Daher sollten sowohl der EGFR-Mutations-, als auch der ALK- und ROS1-Translokationsstatus bestimmt werden. Aktivierende ALK-Translokationen qualifizieren den Patienten für eine Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Crizotinib, wodurch gegenüber der konventionellen Platin- und Pemetrexed-haltigen Therapie unter anderem krankheitsassoziierte Symptome reduziert und die Lebensqualität verbessert werden können. Auch bei Vorliegen der seltenen aktivierenden ROS1-Translokation zeigt eine Therapie mit Crizotinib zum Teil ein besseres Outcome. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Afatinib, Erlotinib oder Gefitinib führen bei Patienten mit EGFR-aktivierenden Mutationen zu höheren Remissionsraten und einem verlängerten progressionsfreien Überleben. (Goeckenjan et al. 2010 und Cheng et al. 2012)

1.3 Das Tumorsuppressorgen p53

1.3.1 Überblick

Auch 38 Jahre nach seiner Entdeckung ist das Interesse an der Erforschung des Tumorsuppressors p53 ungebrochen. Als „Wächter des Genoms“ stellt das Gen eine wichtige Kontrollinstanz innerhalb des Zellzyklus dar. Die Anfänge der Erforschung von p53 waren dabei durchaus holprig. Die ursprüngliche Annahme, es handle sich um das Produkt eines Onkogens und habe protumorige Eigenschaften, gründete sich auf einen einfachen Fehler: Das p53-Gen, das zunächst kloniert und in den initialen Experimenten untersucht worden war, beinhaltete eine Mutation. Während an den tumorsupprimierenden Eigenschaften von p53 heutzutage keine Zweifel mehr bestehen, rückt die vermeintlich falsche Hypothese der onkogenen Wirkung wieder in den Fokus. Verschiedene aktuelle Studien beschreiben „gain-of-function“-Alterationen des Gens und zeigen, dass längst nicht alle Facetten der p53-Funktion und -Dysregulation aufgedeckt sind. (Levine und Oren 2009)

1.3.2 Physiologische Funktion

Ein wichtiger Kontrollpunkt innerhalb des Zellzyklus befindet sich am Übergang von der G1- zur S-Phase und bewahrt die Zelle vor der Replikation defekter DNA. Bei Detektion eines Schadens im Genom einer Zelle wird das Produkt des p53-Gens kurzfristig hochreguliert. Seine Wirkung entfaltet das p53-Protein als Transkriptionsfaktor über die Bildung von Tetrameren durch die Regulation zahlreicher Gene. So wird unter anderem die Transkription des CDKN1A-Gens, das für das CDK-Inhibitor-Protein p21 codiert, aktiviert (Abbildung 4). Das p21-Protein inhibiert in Folge CDK4/D-Cyclin-Komplexe, wodurch wiederum das Rb-Protein in aktivem, hyperphosphoryliertem Zustand gehalten und die Progression der Zelle in die S-Phase verhindert wird. Diese Arretierung in der G1-Phase liefert der Zelle die notwendige Zeit für die Einleitung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen. Bei erfolgreicher DNA-Reparatur sinkt der p53-Proteinspiegel und die Blockade des Zellzyklus wird aufgehoben. (Alberts et al. 2014, Brosh und Rotter 2009, Levine und Oren 2009)



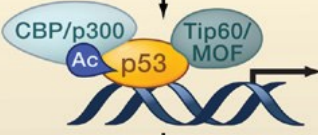
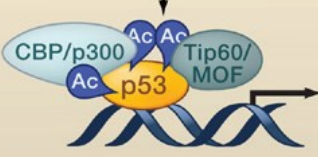
 DNA damage & other types of stress	Transcriptional targets	Biological consequence	p53 modification requirement
A 	MDM2 Pirh2	Feedback and cell survival	Acetylation is not required
B 	p21 GADD45	Growth arrest DNA repair	Partial acetylation is sufficient
C 	BAX PUMA FAS NOXA	Irreversible apoptosis	Specific acetylation is required

Abbildung 4: p53-Funktion und Zielgenregulation. Die Stress-induzierte p53-Aktivierung kann unterschiedliche Szenarien zur Folge haben. (A) Verschiedene Promotor können durch deacetyliertes p53 aktiviert werden. Diese Zielengruppe bewahrt die Zelle vor übermäßiger p53-Aktivierung. Dazu zählen MDM2, Pirh2 und andere. (B) Die Aktivierung von Genen, die in die DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle involviert sind, setzt die Rekrutierung spezifischer Histon-Acetyltransferasen (HATs) und partielle Acetylierung (Ac) von p53 voraus. (C) Die vollständige Acetylierung von p53 ist Voraussetzung für die Aktivierung pro-apoptotischer Gene (u.a. BAX, PUMA, NOXA). (Bildquelle: Kruse und Gu 2009)

Bei Irreparabilität des Schadens erfolgt hingegen die Aktivierung des programmierten Zelltodes, der Apoptose. Die Transkription verschiedener pro-apoptotischer Gene, wie PUMA, NOXA oder BAX, wird ebenfalls durch das p53-Protein gesteuert (Abbildung 4). (Alberts et al. 2014)

Die Fähigkeit zur Induktion eines Zellzyklusstopps und der Apoptose sind die beiden wesentlichen tumorsupprimierenden Eigenschaften des p53-Proteins. Auslöser können dabei nicht nur Schäden der DNA, sondern verschiedene Formen von zellulärem Stress sein. Daneben ist p53 auch in der Lage, die zelluläre Seneszenz als Zustand eines permanenten Zellzyklusarrests einzuleiten. (Brosh und Rotter 2009, Hanahan und Weinberg 2011, Alberts et al. 2014)

Die Generierung einer adäquaten Antwort auf unterschiedlichste Formen von Stress durch p53 macht ein komplexes regulatorisches Netzwerk zur Kontrolle und

Feinabstimmung notwendig. Ein breites Spektrum posttranslationaler Modifikationen beeinflusst die p53-Funktion sowohl im Rahmen der normalen Homöostase, als auch in Reaktion auf verschiedene Stressoren. Ein wesentlicher Schritt der p53-Stabilisierung stellt die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen dar. Die N-terminale Phosphorylierung von Serin-Resten nach Schädigungen der DNA inhibiert beispielsweise die Interaktion zwischen p53 und MDM2 und verhindert so einen Abbau des p53-Proteins. Bei MDM2 handelt es sich um eine endogene E3-Ligase mit hoher Spezifität für p53, die über die Steuerung der Ubiquitin-vermittelten Degradation von p53 eine strenge Kontrolle der zellulären p53-Spiegel erreicht. Kürzlich konnten mit Pirh2 und COP1 zwei weitere E3-Ligasen identifiziert werden, die die p53-Konzentration in der Zelle niedrig halten. Die Acetylierung von p53 durch spezifische Histon-Acetyltransferasen ist ein weiterer Kernmechanismus der p53-Regulation, insbesondere auf transkriptioneller Ebene. Als Reaktion auf verschiedene Stressoren nimmt die Acetylierung von p53 und somit auch dessen Aktivität und Stabilität zu (Abbildung 4). (Kruse und Gu 2009)

1.3.3 Mutationen des p53-Gens und seiner Regulatoren

Die herausragende Bedeutung von p53 für die Zelle wird insbesondere bei einem Ausfall dieser Kontrollmechanismen deutlich. So weisen ca. 50 % aller malignen Tumoren Mutationen des p53-Gens auf Chromosom 17p13.1 auf. Zu den betroffenen Krebsarten zählen das Lungen-, Colon- und Mammakarzinom, drei der häufigsten und oftmals letal verlaufenden Neoplasien des Menschen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Tumorsuppressoren, die vorrangig durch Frameshift- oder Nonsense-Mutationen verändert sind und dementsprechend einen Verlust der Proteinexpression zeigen, weist das p53-Gen überwiegend Missense-Mutationen auf. Die dadurch bedingte Substitution einer einzelnen Aminosäure betrifft häufig die DNA-bindende Region des Proteins, insbesondere sechs „Hotspots“ (R175, G245, R248, R249, R173, R282). Folglich wird die sequenzspezifische Bindung des p53-Proteins an die jeweilige Ziel-DNA beeinträchtigt. Gleichzeitig ergibt sich eine dominant-negative Wirkung der Mutante gegenüber verbliebenen Wildtyp-Allelen infolge der Tatsache, dass die Wirkung von p53 über die Bildung von Tetrameren entfaltet wird. Der mutationsbedingte Verlust der p53-Funktion hat weitreichende Folgen. Die fehlende

Reparatur schadhafter DNA und die Akkumulation von Treibermutationen führen letztlich zur malignen Transformation der Zelle. (Brosh und Rotter 2009, Muller und Vousden 2013, Muller und Vousden 2014, Alberts et al. 2014)

Mutiertes p53-Protein akkumuliert häufig in Tumorzellen. Eine Tatsache, die man sich diagnostisch zu Nutze macht: Der immunhistochemische Nachweis einer hohen p53-Expression in Tumoren weist auf eine Missense-Mutation des Gens hin und vermittelt prognostische und prädiktive Informationen. Wildtyp-p53 in normalen Zellen und Geweben ist hingegen häufig nur in geringer Konzentration zu finden, nicht zuletzt aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und dem raschen Ubiquitin-vermittelten Abbau. Dieser Prozess wird neben der E3-Ubiquitin-Ligase insbesondere auch durch das p53-Zielgen MDM2 reguliert. Störungen dieses negativen Feedback-Mechanismus durch Mutationen, die die Transaktivierung von MDM2 durch p53 beeinträchtigen, führen unter anderem zur Akkumulation von mutiertem p53. (Brosh und Rotter 2009)

Das p53-Gen ist jedoch nicht ausschließlich durch sogenannte „loss-of-function“-Mutationen verändert, die einen Verlust der tumorsupprimierenden Wirkung der Wildtyp-Form zur Folge haben, sondern auch durch „gain-of-function“-Alterationen, die dem Protein onkogene Eigenschaften verleihen. Aktuelle Untersuchungen schreiben mutiertem p53 eine aktive Rolle bei Tumordinvasion und -motilität zu, unter anderem über eine Verbesserung der Signalwirkung des TGF- β - und EGF-Rezeptors (Muller und Vousden 2014). Ein weiterer „gain-of-function“-Mechanismus ergibt sich aus der Interaktion zwischen mutiertem p53 und anderen Mitgliedern seiner Familie. Durch Inaktivierung der Gene für das p63- und p73-Protein wird unter anderem ein Arrest des Zellzyklus verhindert und die Tumorigenese gefördert (Brosh und Rotter 2009).

Dennoch stellen Mutationen des p53-Gens selbst lediglich die Spitze des Eisbergs dar. Das p53-Protein unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen, die ihrerseits mutationsbedingt eine Fehlfunktion von p53 zur Folge haben können. Tatsächlich zeigen zahlreiche Tumoren ohne p53-Mutation stattdessen Mutationen in Genen, die für Proteine mit regulatorischer Wirkung auf p53 kodieren. (Muller und Vousden 2013)

Aufgrund seiner Bedeutung für die Tumorentstehung und -progression ist die Untersuchung potentieller Einflussnehmer auf die p53-Funktion von immenser Wichtigkeit. Hierbei konnte sich innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte ein neuer

Bereich der Forschung etablieren, der die zuvor kaum betrachtete Gruppe der nichtcodierenden RNAs (non-coding RNAs, ncRNAs) in den Fokus rückt.

1.4 microRNAs

1.4.1 Einführung

Während über 90 % des menschlichen Genoms der Transkription zugänglich sind, werden nur etwa 2 % der genetischen Information auch translatiert, also in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Im Rahmen aktueller Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der resultierenden „überschüssigen“ Transkripte auf funktionelle nichtcodierende RNAs (ncRNAs) entfällt. Basierend auf der Länge bzw. Anzahl der Nukleotide (nts) ist eine Unterteilung der ncRNAs in drei Gruppen möglich: kurze ncRNAs (17 – 30 nts), zu denen unter anderem die microRNAs (miRNAs) gehören, ncRNAs mittlerer Länge (20 – 200 nts) und lange ncRNAs (> 200 nts), die die sogenannten zirkulären RNAs (circRNAs) beinhalten. Neben der Regulation wichtiger physiologischer Prozesse, wie Chromatin-Modifikationen, Gentranskriptionen und mRNA-Translationen, scheinen ncRNAs an der Pathogenese verschiedener Krankheiten, einschließlich der Tumorentstehung, beteiligt zu sein. (Deng und Sui 2013)

1.4.2 Biogenese und Wirkungsweise

Die Bildung der einzelsträngigen microRNAs erfolgt in einem mehrstufigen Prozess ausgehend von größeren Vorläufermolekülen. Das Prinzip ist in Abbildung 5 dargestellt. Zunächst werden unter Vermittlung der RNA-Polymerase II die primären microRNAs (pri-miRNAs) synthetisiert. Eine im Zellkern lokalisierte Ribonuklease (DROSHA) setzt daraus Vorläufermoleküle (pre-miRNAs) mit einer Länge von 60 bis 70 Nukleotiden frei, die über interne Basenpaarungen haarnadelförmige Loops ausbilden. Nach Export der pre-miRNAs ins Zytoplasma über Ran-GTP und den Auswärtstransporter Exportin-5 kann hier durch die Ribonuklease Dicer1 eine doppelsträngige RNA von ca. 21 Nukleotiden Länge ausgeschnitten werden. Sofern nicht beide, sondern lediglich einer der Stränge die funktionelle microRNA bildet,

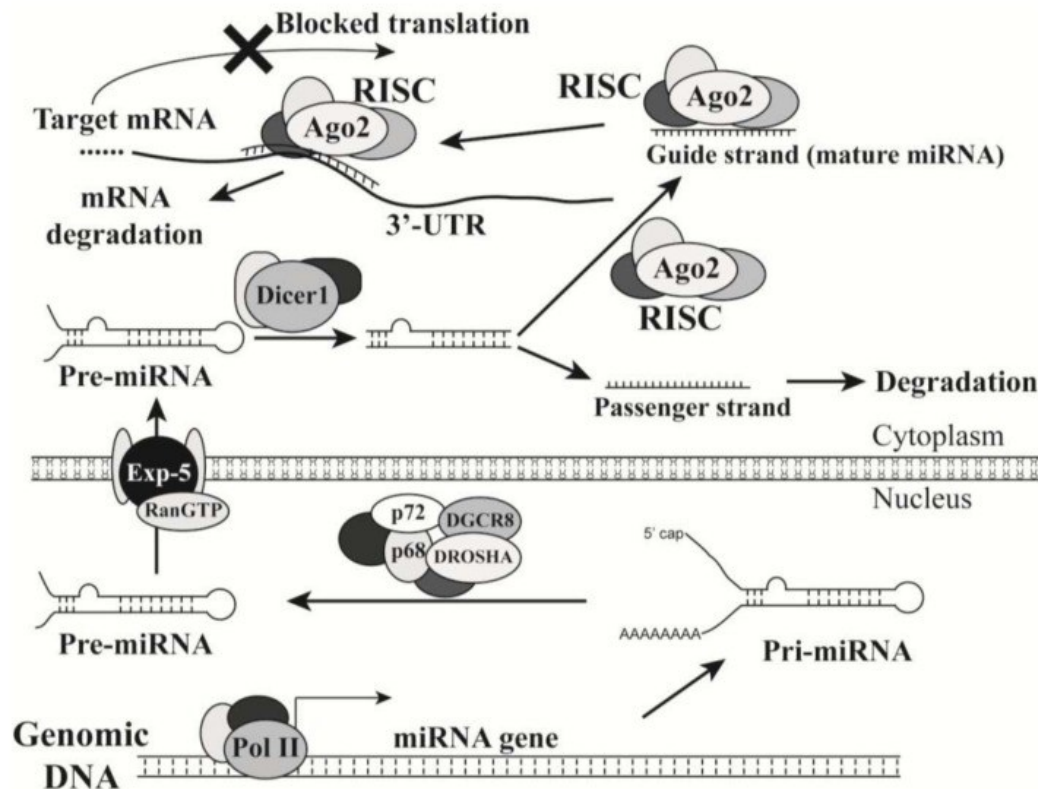


Abbildung 5: microRNA-Biogenese und Wirkungsprinzip. Eine microRNA wird durch die RNA-Polymerase II (Pol II) unter Vermittlung verschiedener Transkriptionsfaktoren (u.a. p53 und c-Myc) transkribiert. Die entstandene pri-miRNA wird durch den DROSHA-Komplex prozessiert und bildet so die pre-miRNA, die über Exportin-5 und Ran-GTP aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. Hier wird die pre-miRNA durch den Dicer1-Komplex weiterverarbeitet, sodass eine doppelsträngige Struktur aus Führungs- und Begleitstrang entsteht. Der Führungsstrang bindet mit dem RNA-induced silencing complex (RISC) an eine komplementäre Ziel-mRNA und inhibiert deren Translation. (Bildquelle: Deng und Sui 2013)

erfolgt eine rasche Degradation des verbliebenen Strangs. Die reife microRNA formt mit diversen Proteinkomponenten, unter anderem mit dem RNA-bindenden Protein Argonaut (Ago), den RNA-induced silencing complex (RISC), der anschließend über spezifische Basenpaarungen an eine komplementäre mRNA bindet. Dadurch können verschiedene Prozesse eingeleitet werden.

Bei vollständiger Komplementarität der microRNA zu einem Abschnitt der mRNA, der meist im nichtcodierenden 3'-Bereich lokalisiert ist, wird der Abbau der mRNA eingeleitet oder eine Repression der Translation bewirkt. Eine andere Folge der Interaktion zwischen microRNA und mRNA kann die Beschleunigung der mRNA-Degradation sein, bedingt durch einen Abbau des Poly(A)-Schwanzes derselben. (Bartel 2004, Alberts et al. 2014)

Die Bindung an die Ziel-mRNA erfolgt über eine spezielle Sequenz mit einer Länge von sieben Nukleotiden am 5'-Ende der microRNAs. Auf der Grundlage identischer Sequenzen in diesem Bereich werden microRNAs zu Familien zusammengefasst, die folglich in der Lage sind, die gleiche Serie von Genen zu regulieren. MicroRNAs stellen damit wichtige Kontrolleure der Genexpression dar. Man geht heute davon aus, dass eine einzelne microRNA rund 200 Gene zu regulieren vermag. (Bartel 2004, Deng und Sui 2013, Alberts et al. 2014)

1.4.3 microRNAs und Onkogenese

Der enorme Einfluss der microRNAs auf die Expression unterschiedlichster Gene legt den Schluss nahe, dass eine Dysregulation dieser Ribonukleinsäuren einen Anteil an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, einschließlich der Entstehung maligner Tumoren, hat. Bedeutend ist insbesondere die Rolle der microRNAs bei der Steuerung von Prozessen wie Zellüberleben und Proliferation, Angiogenese oder Epithel-Mesenchym-Transition (EMT). Beteiligte microRNAs können in Abhängigkeit ihrer Zielstrukturen in onkogen und tumorsuppressiv wirkende Gruppen unterteilt werden, je nachdem, ob die Expression proteinkodierender Onkogene (tumorsuppressive microRNAs) oder tumorsupprimierender Gene (onkogene microRNAs) gehemmt wird. Teilweise können microRNAs auch beide Wirkungen zeigen. (Deng und Sui 2013)

Ein Zusammenhang zwischen microRNAs und der Onkogenese konnte erstmalig 2002 nachgewiesen werden. In einer Studie von Calin et al. zeigten sich in der Mehrzahl der untersuchten Fälle von chronischer lymphatischer Leukämie Deletionen oder Herabregulierungen der beiden microRNA-Gene miR-15 und miR-16 auf Chromosom 13q14 (Calin et al. 2002). Zahlreiche weitere Tumorentitäten sind seither auf Störungen hinsichtlich der microRNA-Expression untersucht worden. Entsprechende Veränderungen ergaben sich unter anderem in Mamma-, Colon- und Lungenkarzinomen (Iorio et al. 2005, Cummins et al. 2006 und Yanaihara et al. 2006).

1.4.4 Die Interaktion zwischen p53 und microRNAs

Seit der Entdeckung der microRNAs als zentrale Regulatoren der Genexpression ist ihr Zusammenspiel mit verschiedenen Schlüsselgenen der Tumorentstehung, wie PTEN oder c-Myc, Gegenstand intensiver Forschungen. Auch die Einbindung der microRNAs in den p53-pathway wurde bereits in mehreren Arbeiten dargelegt.

Ein besonders intensiv untersuchtes Ziel von p53 stellt die miR-34-Familie dar. Die dazugehörigen microRNAs miR-34a, miR-34b und miR-34c erhalten unter anderem über die Repression der proliferativ wirkenden Gene c-Myc und BCL2 tumorsuppressive Eigenschaften. Zum wesentlichen Wirkspektrum dieser microRNA-Familie zählt die Induktion von Apoptose, Zellzyklusarrest und zellulärer Seneszenz (Takwi und Li 2009, Deng und Sui 2013). Die Inhibierung der Expression des Silent Information Regulator 1 (SIRT1) durch miR-34a führt dabei zur vermehrten Acetylierung von p53 und resultiert in einer erhöhten Expression der p53-Zielgene p21 und PUMA (Takwi und Li 2009).

Gleichzeitig ist p53 durch die Verknüpfung mit dem DROSHA-Komplex unmittelbar in den Reifungsprozess der microRNAs eingebunden und ermöglicht die DROSHA-vermittelte Verarbeitung der pri-miRNAs. Bei einer p53-Mutation hingegen kommt es durch eine Beeinträchtigung des DROSHA-Komplexes zu einer Abschwächung der microRNA-Prozessierung. Zu den microRNAs, die auf diese Art durch p53 reguliert werden, zählen unter anderem miR-15a, miR-143 oder miR-199a. (Suzuki et al. 2009)

Auch die p53-Expression wird durch microRNAs reguliert. In einer Untersuchung durch Pichiorri et al. konnte nachgewiesen werden, dass p53 die Expression der microRNAs miR-192, miR-194 sowie miR-215 aktiviert. Diese microRNAs unterdrücken die Expression der Ubiquitin E3-Ligase MDM2, die unter normalen Bedingungen die Ubiquitinierung von p53 und damit dessen Degradation einleitet. Die Herabregulierung der genannten microRNAs in Multiplen Myelomen führt demgemäß zu erhöhten MDM2-Spiegeln und damit vermehrtem p53-Abbau. (Pichiori et al. 2010)

Das microRNA-p53-Netzwerk scheint aus komplizierten Regelkreisen und Feedback-Mechanismen zu bestehen, in die zahlreiche unterschiedliche microRNA-Familien eingebunden sind. Die komplexen Interaktionen sind dabei bisher nur zu einem Bruchteil aufgeklärt.

1.4.5 Klinisch-praktische Relevanz der microRNAs

Neben dem Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese von Tumorerkrankungen und der Regulationsmechanismen sowie -störungen des p53-Gens ergibt sich aus der Erforschung der microRNAs auch ein Nutzen für den klinischen Alltag.

Diese praktische Relevanz konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden. So ließen sich frei zirkulierende microRNAs sowohl im Plasma als auch im Urin von Prostatakarzinompatienten nachweisen. Auf der Grundlage dieser Beobachtung konnte ein hilfreicher Biomarker etabliert werden: Die PCA3-ncRNA als Genprodukt des Prostate cancer antigen 3 (PCA3, DD3) zeigt eine deutliche Überexpression in Prostatakarzinomzellen und wird bereits im Rahmen des nicht-invasiven PCA3-Testes an Urinproben zur Tumordiagnostik eingesetzt. (Hessels et al. 2003 und Mitchell et al. 2008)

Ferner eignen sich Expressionsprofile reifer microRNAs als diagnostisches Hilfsmittel bei der Identifizierung des Ursprungsgewebes schlecht differenzierter Tumoren. Zhang et al. heben die Bedeutung der microRNAs als potentielle Hilfsmittel in der korrekten Diagnose der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome hervor, die – wie bereits an anderer Stelle dargelegt – insbesondere für die Wahl einer geeigneten Therapie von immenser Wichtigkeit ist. Niedrig-differenzierte Karzinome stellen hierbei eine besondere Herausforderung für den Pathologen dar. Charakteristische microRNA-Expressionsmuster können eine genaue Klassifizierung ermöglichen. So sind bereits für zahlreiche microRNAs, unter anderem miR-205, miR-99b und miR-102 Expressionsunterschiede zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinom nachgewiesen worden. (Zhang et al. 2014)

2 ZIELE DER ARBEIT

Das Lungenkarzinom zählt zu den häufigsten und gleichzeitig zu den besonders schwerwiegenden malignen Neoplasien des Menschen. Auch die Belastung für das Gesundheitssystem ist beträchtlich – rund 1,5 Milliarden Euro Krankheitskosten entstanden im Jahr 2008 durch Tumoren der Lunge. Schätzungsweise 70 % der kleinzelligen Bronchialkarzinome und 50 % der nicht-kleinzelligen Tumoren weisen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 auf. Die enorme Bedeutung von p53 für die Onkogenese erklärt das beständige Interesse an der Erforschung neuer Regulationsmechanismen und -störungen des Gens.

Eine besondere Herausforderung in der pathologischen Tumordiagnostik stellen schlecht differenzierte Karzinome dar. Die Entwicklung neuer Hilfsmittel zur exakten Bestimmung der vorliegenden Tumorentität ist vor dem Hintergrund unterschiedlicher therapeutischer Konsequenzen von immenser Wichtigkeit. Mit der Gruppe der nichtcodierenden RNAs konnte sich hier ein neuer Zweig der Forschung etablieren, der auch für den klinischen Alltag relevant werden könnte. Die Hoffnung liegt dabei auf der Entwicklung „molekularer Profile“ von Tumoren, die möglicherweise als Prädiktoren für klinisches Outcome und Therapieansprechen dienen können. Einige nichtcodierende RNAs stehen zudem bereits heute als nützliche Biomarker zur Verfügung.

Die vorliegende Arbeit hat in Form eines experimentellen Projektes das Zusammenspiel zwischen 11 microRNAs und dem Tumorsuppressorgen p53 in Lungentumoren untersucht. Hierfür wurden Mutations- und Expressionsanalysen in humanen Lungenkarzinomzelllinien und Tumorgewebeproben mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Sequenzierungen durchgeführt. Ziel war die Klärung der Fragestellung, inwieweit eine vom Mutationsstatus abhängige, wechselseitige Beeinflussung zwischen microRNAs und dem Tumorsuppressorgen p53 besteht.

Neben einem Beitrag zum besseren Verständnis der an der Onkogenese beteiligten Prozesse sollte so ein weiterer Baustein des komplexen Regulationsnetzwerkes um das p53-Gen entschlüsselt werden. Die Feststellung charakteristischer mutationsabhängiger microRNA-Expressionsprofile könnte zudem einen diagnostischen und prognostischen Nutzen haben.

Zusammenfassend lassen sich daher folgende Fragestellungen formulieren:

- Ergeben sich im Zellkulturmodell relevante microRNA-Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Zelllinien?
- Lassen sich Unterschiede in der p53-Expression und p53-Zielgenexpression in Abhängigkeit des Mutationsstatus der Tumorzelllinien nachweisen?
- Existieren Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens in den zu untersuchenden Tumorproben?
- Kann im Tumorgewebe ein vom p53-Mutationsstatus abhängiges charakteristisches Expressionsmuster für microRNAs nachgewiesen werden?

3 MATERIAL

3.1 Laborequipment und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Übersicht über eingesetztes Laborequipment und Verbrauchsmaterial

Material/Ausrüstung	Hersteller
0,1 ml PCR-Röhrchen (Strip Tubes)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
0,5/1,5/2,0 ml Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5 mm Elektrophorese-Kamm (10-well)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
10/100/200/1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15/50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
2/5/10/25/50 ml sterile Glaspipetten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
75 cm ² -Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Abdeckung für PCR-Röhrchen (Cap Strips)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Echtzeit-PCR-Gerät Rotor Gene Q	QIAGEN, Venlo, Niederlande
Elektrophorese Power Supply EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Elektrophorese-Gelkammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Heizplatte Thriller Heating Block	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Inkubator MCO-17AI-CO2	Sanyo, Moriguchi, Japan

Kammerobjektträger Countess 50 Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Werkbank Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PEQAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipettierhelfer Accu-Jet	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Sicherheitswerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler Pqstar 96 Universal	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Umkehrmikroskop Televal 31	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
UV-Fotokammer FluorChem FC2 Imaging System	Alpha Innotech, Santa Clara, USA
Vakuum-Pumpe Mini-Vac eco	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wärmebad	GFI, Gilching, BRD
Zellzählgerät Countess Automated Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zentrifuge Perfect Spin 24	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Kirchlingern, Deutschland

3.2 Chemikalien und Zellkulturreagenzien

Tabelle 2: Übersicht zu verwendeten Chemikalien und Zellkulturreagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
10 x Reactionbuffer S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
6 x DNA Loading Dye 1 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Deparaffinization Solution	QIAGEN, Venlo, Niederlande
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol	Merck-Biochrom, Berlin, Deutschland
FastStart Universal SYBR Green Master	Roche, Basel, Schweiz
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck-Biochrom, Berlin, Deutschland
GelRed Nucleic Acid Stain 10,000 x in water	Biotium, Hayward, USA
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (0,1 µg/µl, 50 µg)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hot Taq-DNA Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
RPMI-1640	Merck-Biochrom, Berlin, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA	Merck-Biochrom, Berlin, Deutschland

3.3 Primer-Sequenzen

Tabelle 3: Sequenzen der eingesetzten PCR-Primer

Gen	Exon	Richtung	Sequenz
Primer für die p53-Expressions- und p53-Zielgenexpressionsanalysen			
BAX		Forward	5'-CCCGAGAGGTCTTTTTCC-3'
		Reverse	5'-GCCTTGAGCACCAGTTTG-3
GAPDH		Forward	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'
		Reverse	5'-AGGAGGCATTGCTGATGAT-3'
NOXA		Forward	5'-GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA-3'
		Reverse	5'-CCTGAGCAGAAGAGTTTGGA-3'
p21		Forward	5'-AAGACCATGTGGACCTGT-3'
		Reverse	5'-GGTAGAAATCTGTCATGCTG-3'
p53		Forward	5'-GGTGGTGCCCTATGAGCCG-3'
		Reverse	5'- TCCTCTGTGCGCCGGTCTC-3'
PUMA		Forward	5'-GACCTCAACGCACAGTA-3'
		Reverse	5'-CTAATTGGGCTCCATCT-3'
Primer für die p53-Mutationsanalysen			
p53	5	Forward	5'-TGACTTTCAACTCTGTCTCC-3'
		Reverse	5'-TCAGTGAGGAATCAGAGGCC-3'
	6	Forward	5'-CTGGAGAGACGACAGGGCTG-3'
		Reverse	5'-CCAGAGACCCCAGTTGCAAAC-3'
	7	Forward	5'-CTCGCGCACTGGCCTCATCTT-3'
		Reverse	5'-TCAGCGGCAAGCAGAGGCTG-3'
	8	Forward	5'-GGACAGGTAGGACCTGATTTCTTAC-3'
		Reverse	5'-TGCACCCTTGGTCTCCTCCAC-3'

3.4 Kits und Assays

Tabelle 4: Eingesetzte Kits bzw. Assays

Kit/Assay	Hersteller
DNA Clean & Concentrator-5 Kit	Zymo Research, Irvine, USA
miRNeasy FFPE Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
miRNeasy Mini Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
miScript II RT Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
miScript Primer Assays	QIAGEN, Venlo, Niederlande
miScript SYBR Green PCR Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande

3.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer bzw. Lösungen

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
1,5 %iger Agar	6 g Agarose 400 ml 1 x TAE-Puffer
10 x PBS (1 l)	2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 80 g NaCl = pH 7,4
50 x TAE-Puffer (1 l)	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH = 8)

4 METHODIK

4.1 microRNA-Expressionsanalyse an Lungenkarzinomzelllinien

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurden 8 Lungenkarzinomzelllinien mit bekanntem p53-Mutationsstatus auf die Expression verschiedener microRNAs untersucht. Abbildung 6 liefert einen Überblick zum Ablauf dieser Experimentalreihe. Zunächst wurden die Zellen in der Monolayer-Zellkultur bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 90 % gezüchtet. Aus den anschließend geernteten Zellpellets erfolgte die Extraktion von RNA unter Verwendung eines speziellen Kits, das insbesondere eine Anreicherung der kurzsträngigen microRNAs ermöglicht. Nach Umschreiben der RNA in cDNA durch Reverse Transkription wurden die Expressionsmuster in der quantitativen Echtzeit-PCR mit anschließender statistischer Auswertung bestimmt.

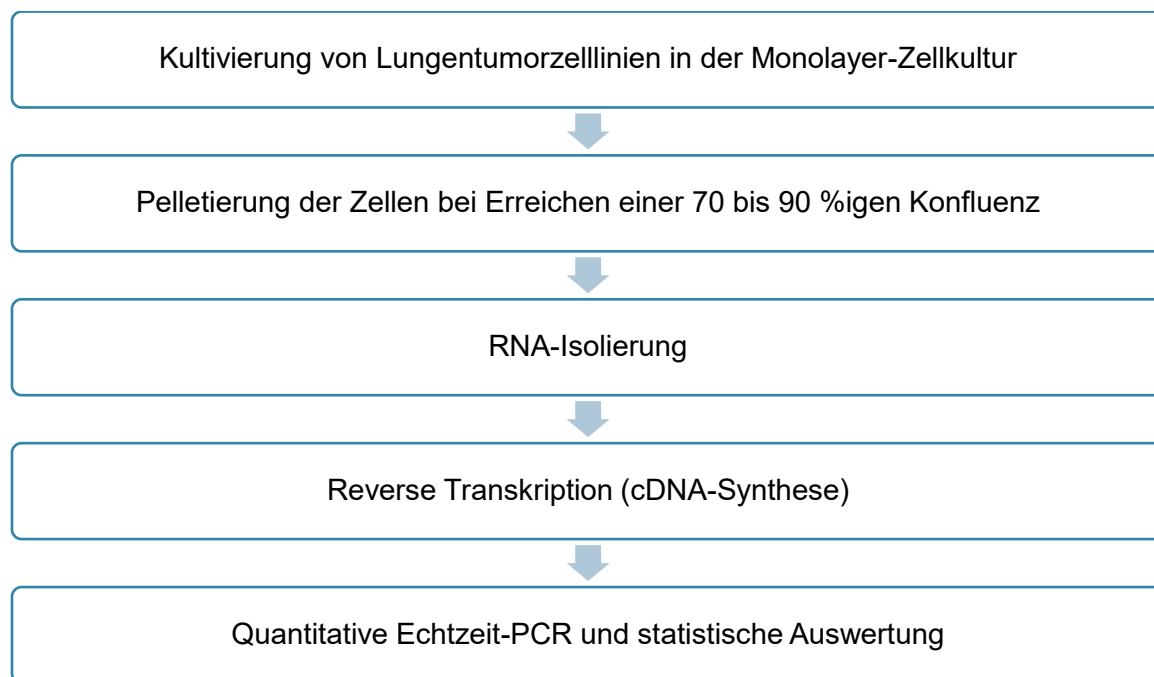


Abbildung 6: Versuchsablauf

4.1.1 Ausgewählte Zelllinien

Für die Zellkulturexperimente wurden 8 humane Lungenkarzinomzelllinien ausgewählt, die über die ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) bezogen wurden. Es handelte sich ausnahmslos um adhärent wachsende Kulturen vom epithelialen Zelltyp. Die verwendeten Zelllinien werden im Folgenden kurz porträtiert, ein Überblick über ihre wesentlichen Charakteristika, einschließlich des p53-Mutationsstatus wird in Tabelle 6 gegeben. Für vier der Zelllinien (NCI-H157, NCI-H2170, NCI-H322 und NCI-H1975) konnte auf Daten aus p53-Mutationsanalysen zurückgegriffen werden, die bereits im Rahmen einer anderen Studie am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena erhoben worden waren. Der Mutationsstatus der übrigen vier Zelllinien wurde dem Cell Lines Project des Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC, Version 82) des Sanger Institutes entnommen.

A549

Es handelt sich um Lungenkarzinomzellen, die 1972 durch Giard et al. aus dem Tumorgewebe eines 58-jährigen Mannes entnommen wurden. Das p53-Gen liegt hier in seiner Wildtyp-Form vor. Die Verdopplungszeit der Zellpopulation beträgt etwa 22 Stunden.

NCI-H23

Die Zellen aus dem Adenokarzinom eines 51-jährigen männlichen Patienten beherbergen eine p53-Mutation in Codon 246. Diese Veränderung führt zu einem Austausch der Base Guanin gegen Cytosin (ATG>ATC), entsprechend der Synthese der Aminosäure Isoleucin statt Methionin (Missense-Mutation).

NCI-H157

Hierbei handelt es sich um Zellen eines Plattenepithelkarzinoms eines 59 Jahre alten Mannes, die nicht aus dem Primärtumor, sondern aus dem begleitenden malignen Pleuraerguss gewonnen wurden. Das p53-Gen der im Jahre 1979 etablierten Zelllinie zeigt eine Stopp-Mutation in Codon 298.

NCI-H322

Die Zellen entstammen dem metastasenhaltigen Weichgewebe eines 52-jährigen männlichen Patienten und wurden nach Beginn der Chemotherapie entnommen. Es handelt sich um Zellen eines bronchioloalveolären Karzinoms, die eine p53-Missense-Mutation in Codon 248 zeigen, entsprechend dem Austausch der Base Guanin gegen Thymin (CGG>CTG). Hieraus folgt die Synthese von Leucin statt Arginin.

NCI-H1650

Diese Linie aus dem Jahr 1987 hat ihren Ursprung in den Tumorzellen eines malignen Pleuraergusses eines 27-jährigen männlichen Rauchers. Als Primärtumor lag ein Adenokarzinom der Lunge vor. Eine p53-Mutation ist nicht vorhanden.

NCI-H1975

Die Zellen leiten sich aus dem Adenokarzinom einer weiblichen Patientin ab. Durch eine Missense-Mutation in Codon 273 kommt es aufgrund eines Basenaustausches von Guanin gegen Adenin zur Synthese der Aminosäure Histidin statt Arginin.

NCI-H2030

1988 konnte die Zelllinie aus dem Gewebe eines metastasierten Lymphknotens etabliert werden, der männliche Spender war zuvor an einem Adenokarzinom der Lunge erkrankt. Das p53-Gen ist hier nicht mutiert.

NCI-H2170

Die Zellen aus dem Lungentumorgewebe eines männlichen Nicht-Rauchers zeigen eine plattenepitheliale Differenzierung. Aufgrund einer Basensubstitution in Codon 158 des p53-Gens (CGC>GGC) resultiert die Synthese von Glycin anstelle von Arginin.

Tabelle 6: Überblick über verwendete Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	Tumorentität	P53-Mutationsstatus
A549	Lunge	Karzinom	Wildtyp
NCI-H23	Lunge	NSCLC, Adenokarzinom	p.M246I
NCI-H157	Lunge; Pleuraerguss	NSCLC, Plattenepithelkarzinom	p.Q298X
NCI-H322	Lunge; Weichgewebe	NSCLC, Bronchioalveoläres Karzinom	p.R248L
NCI-H1650	Lunge; Pleuraerguss	Adenokarzinom; Bronchioalveoläres Karzinom	Wildtyp
NCI-H1975	Lunge	NSCLC, Adenokarzinom	p.R273H
NCI-H2030	Lunge; Lymphknoten	NSCLC, Adenokarzinom	Wildtyp
NCI-H2170	Lunge	NSCLC, Plattenepithelkarzinom	p.R158G

4.1.2 Aussaat und Kultivierung der Zellen in der Monolayer-Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Herasafe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

Das kryokonservierte Zellmaterial wurde zunächst rasch im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, welches bereits vorgewärmtes Medium enthielt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 300 g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Durch diesen Waschschrift sollte das zytotoxisch wirkende Gefrierschutzmittel (DMSO, Dimethylsulfoxid) entfernt werden. Die Zellen konnten

dann in sterile 75 cm²-Kulturflaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) eingesät und mit 15 ml Nährmedium überschichtet werden. Nach etwa zwölf Stunden wurde die Anheftung der Zellen und damit der Erfolg der Aussaat mikroskopisch beurteilt.

Zur Kultivierung wurden die Flaschen bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % im Inkubator (MCO-17AI-CO₂-Incubator, Sanyo, Moriguchi, Japan) gelagert. Als Basalmedium diente RPMI-1640 (Merck Biochrom, Berlin, Deutschland), das durch Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) von 10 % zum Gesamtvolumen das vollständige Nährmedium bildete. Durch tägliche optische Kontrollen der Kulturflaschen im Umkehrmikroskop wurden das Wachstum der Zellen und der Zustand des Nährmediums kontrolliert. Ein Mediumwechsel wurde in der Regel alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Ziel war das Erreichen einer Konfluenz des Zellrasens von 70 bis 90 %.

4.1.3 Ernten von Zellpellets

Nach Kultivierung der Zellen wie unter 4.1.2 beschrieben erfolgte das Ernten in Form von Zellpellets bei Erreichen einer 70 bis 90 %igen Konfluenz. Zunächst wurden die benötigten Lösungen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nach Absaugen des alten Mediums aus den Zellkulturflaschen erfolgte die Zugabe von 2 ml kalzium- und magnesiumfreier phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS). Durch diesen Waschschrift sollten verbliebene Mediumreste entfernt werden, um eine Beeinträchtigung der Trypsinwirkung zu vermeiden. Nach Absaugen der PBS-Lösung wurde durch Hinzufügen von 0,5 ml Trypsin-EDTA (Merck Biochrom, Berlin, Deutschland) das Detachment des Zellrasens eingeleitet. Nach kurzer Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und sanftem Abklopfen der Kulturflasche wurde der Erfolg der enzymatischen Ablösung des Monolayers im Umkehrmikroskop kontrolliert. Durch Zugabe von 2 ml serumhaltigen Mediums wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Zellsuspension anschließend in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Aus einem Teilvolumen der Suspension wurde die Zellzahl mithilfe eines automatischen Zellzählgerätes (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen, Carlsbad, USA) bestimmt. Hierfür wurden 10 µl eines 1:1-Gemischs aus Zellprobe und Trypanblau auf

den gerätespezifischen Objektträger aufgetragen und dieser sodann in das Gerät eingeführt. Durch Multiplikation der automatisch ermittelten Lebendzellzahl (Z_{leb}) mit dem Verdünnungsfaktor ergab sich die Gesamtzahl lebender Zellen (Z_{ges}) in 1 ml der Suspension:

$$Z_{\text{ges}} = Z_{\text{leb}} \times 2$$

Für die nachfolgende RNA-Extraktion wurde ein maximal $3,0 \times 10^6$ Zellen enthaltendes Aliquot der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 300 g pelletiert. Nach Aspiration des Überstandes wurde aus den so geernteten Zellen unmittelbar die RNA-Extraktion durchgeführt.

4.1.4 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Extraktion der Gesamt-RNA einschließlich der kurzsträngigen microRNAs aus den Zellpellets fand das miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Niederlande) Verwendung. Eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinthiocyanat bewirkte dabei zunächst die Lyse der Zellen, Inaktivierung von RNasen und Eliminierung eines Großteils der zellulären DNA und Proteine. Unter Vermittlung einer speziellen Säule wurde die RNA im Anschluss isoliert, aufgereinigt und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Gemäß Protokoll des Herstellers erfolgten durch Hinzugabe von 700 µl QIAzol Lysis Reagent zum Zellpellet und anschließendem Vortexen zunächst Lyse und Homogenisierung der Zellen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde dem Gemisch 140 µl Chloroform zugesetzt. Durch Zentrifugation bei 12.000 g bei 4 °C wurde die Separation des Reaktionsgemisches in drei Phasen erreicht: eine wässrige RNA-haltige obere Phase, eine DNA-haltige Interphase und eine darunterliegende organische Phase. Die RNA-haltige obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Hinzugabe von 525 µl Ethanol (100 %) wurde die RNA präzipitiert. Durch schrittweises Überführen von je 700 µl der Probe in die RNeasy Mini Spin Column und anschließende Zentrifugation bei 8.000 g für wenige Sekunden sollte die RNA an die Säulenmembran gebunden werden. Um Phenolreste und andere Kontaminationen zu entfernen, wurde die Säule zweimalig mit je 500 µl RPE-Buffer gewaschen. Eine

anschließende Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit für eine Minute diente der Eliminierung verbliebener Puffer-Reste. In einem letzten Schritt erfolgte die Elution der RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser. Nach spektrophotometrischer RNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Eluat bis zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

4.1.5 RNA-Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer

Um die extrahierten Ribonukleinsäuren auf ihre Reinheit zu überprüfen und das benötigte RNA-Ausgangsvolumen für die Reverse Transkription bestimmen zu können, wurde ein Spektrophotometer eingesetzt. Das Grundprinzip ist die Messung der Absorption eines definierten Probenvolumens bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}). Die Analyse erfolgte aus 1 µl der jeweiligen Probe im NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und der zugehörigen Software. Das Verhältnis aus den Absorptionen bei 260 bzw. 280 nm (A_{260}/A_{280} -Verhältnis) erlaubte eine Aussage über potentielle Kontaminationen der RNA, beispielsweise durch Proteine oder Phenol. Als Mindestanforderung für die weitere Verwendung der Proben wurde ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,8 festgelegt.

4.1.6 Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA als Ausgangsmaterial für die quantitative Echtzeit-PCR mittels Reverser Transkription wurde das miScript II RT Kit (QIAGEN) eingesetzt. Die reifen microRNAs werden durch eine Poly(A)Polymerase (enthalten im miScript Reverse Transcriptase Mix) an ihrem 3'-Ende polyadenyliert und mittels oligo-dT-Primern durch die enzymatische Wirkung der Reversen Transkriptase (ebenfalls Teil des miScript Reverse Transcriptase Mix) in cDNA transkribiert. Beide Schritte erfolgen parallel in einem Zentrifugenröhrchen. Die universelle Tag-Sequenz am 5'-Ende der oligo-dT-Primer ermöglicht die Amplifizierung reifer microRNAs in der nachgeschalteten Echtzeit-PCR. Das Prinzip der Reversen Transkription ist in Abbildung 7 dargestellt.

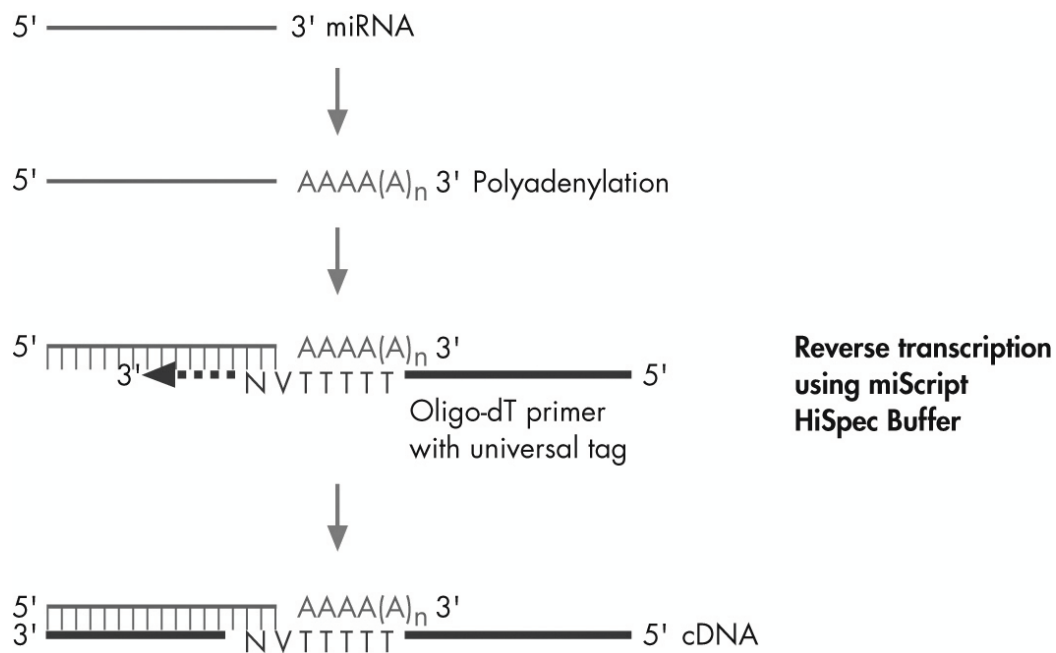


Abbildung 7: Ablauf der Reversen Transkription. Nach Polyadenylierung der reifen microRNAs an ihrem 3'-Ende erfolgt die Transkription in cDNA mittels oligo-dT-Primern unter Vermittlung der Reversen Transkriptase. (Bildquelle: QIAGEN)

Zum Schutz vor Degradation wurden die RNA-Proben zunächst auf Eis gelagert. Der Reaktionsansatz wurde entsprechend den Herstellerangaben, wie in Tabelle 7 aufgeführt, pipettiert. Pro Reaktionsansatz wurde eine RNA-Menge von 800 ng verwendet und mit einer entsprechenden Menge RNase-freien Wassers auf ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Komponente	Volumen
miScript HiSpec buffer	4 µl
miScript Nucleics mix	2 µl
RNase-freies Wasser	Variabel
miScript Reverse Transcriptase mix	2 µl
RNA	Variabel (entsprechend 800 ng)
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>20 µl</u>

Im Anschluss erfolgte zunächst eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C, danach eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C zur Inaktivierung des miScript Reverse Transcriptase Mix. Die cDNA wurde in Vorbereitung auf die quantitative Echtzeit-PCR anschließend mit RNase-freiem Wasser in einem 1:20-Verhältnis verdünnt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

4.1.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) basiert auf dem Prinzip der enzymatisch vermittelten Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes. Ausgehend von einem Primer, der als Startpunkt für die DNA-Synthese dient, erfolgt mithilfe einer DNA-Polymerase die Anlagerung von Nukleotiden an den Matrizenstrang. Im Ergebnis entsteht ein zur Original-DNA komplementäres Amplifikat. Das typische PCR-Programm setzt sich aus drei wesentlichen Schritten zusammen: der Denaturierung, um die Stränge der Template-DNA aufzutrennen, dem Annealing, also der Hybridisierung der Primer an den DNA-Einzelstrang, sowie der Elongation, das heißt der Verlängerung des zu synthetisierenden Stranges mittels DNA-Polymerase. Durch Wiederholung dieser Schritte im Rahmen mehrerer PCR-Zyklen können unzählige Kopien der Template-DNA hergestellt werden.

Eine besondere Anwendungsmöglichkeit dieses Grundprinzips der DNA-Vervielfältigung stellt die quantitative Echtzeit-PCR dar. Unter Verwendung interkalierender Farbstoffe kann durch Fluoreszenz-Messungen, die in Echtzeit während eines PCR-Zyklus durchgeführt werden, eine Quantifizierung der gewonnenen DNA erfolgen.

4.1.7.1 Eingesetzte Primer Assays

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden 12 Primer der Firma QIAGEN (miScript Primer Assays) ausgewählt. 11 der Primer dienten dem Nachweis reifer microRNAs. Ein zwölfter Primer für die snRNA RNU6-2 wurde als externe Kontrolle bzw. Haushaltsgen mitamplifiziert, um eine Quantifizierung und Normalisierung der PCR-

Daten zu ermöglichen. Im Folgenden werden alle verwendeten Primer Assays tabellarisch aufgeführt:

Tabelle 8: miScript Primer Assays

Hs_RNU6-2_11	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der snRNA RNU6-2 ▪ Externe Kontrolle zur Normalisierung der PCR-Daten
Hs_miR-18a_2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-18a-5p
Hs_miR-23a*_2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-23a-5p
Hs_miR-1285_2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-1285-3p
Hs_miR-141_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-141-3p
Hs_miR-15a*_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-15a-3p
Hs_miR-380-5p_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-380-5p
Hs_miR-504_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-504-5p
Hs_miR-200a_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-200a-3p
Hs_miR-25_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-25-3p
Hs_miR-30d_2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-30d-5p
Hs_miR-518c-5p_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis der reifen microRNA hsa-miR-518c-5p

4.1.7.2 Versuchsdurchführung

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung des miScript SYBR Green PCR Kits (QIAGEN) auf einem Rotor Gene Q (QIAGEN) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die in einem Verhältnis von 1:20 verdünnten cDNA-Proben wurden zum Schutz vor Degradation zunächst auf Eis vorsichtig aufgetaut. Der Reaktionsansatz wurde, wie in Tabelle 9 angegeben, vorbereitet und in die entsprechenden Rotor-Gene-Röhrchen pipettiert. Pro Probe erfolgten jeweils Dreifachbestimmungen. Zusätzlich wurde eine wasserhaltige Negativkontrolle für jedes Gen mitgeführt.

Die microRNA-spezifischen miScript Primer Assays fungierten bei der PCR als Forward Primer; der im SYBR Green Kit enthaltene Universal Primer bewirkte nach

Hybridisierung an die Template-DNA die Synthese in entgegengesetzter Richtung (Reverse Primer).

Zur Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase wurde das PCR-Programm mit einer fünfzehnminütigen Inkubation bei 95 °C gestartet, auf die anschließend 40 PCR-Zyklen folgten. Jeder Zyklus bestand hierbei aus drei Schritten: der Denaturierung bei 94 °C für 15 Sekunden, dem Annealing bei 55 °C für 30 Sekunden und der Elongation bei 70 °C für ebenfalls 30 Sekunden. Export und Auswertung der digitalen Daten erfolgte mithilfe der Rotor Gene Q Series Software (QIAGEN, Version 2.3.1).

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR

Komponente	Volumen pro PCR-Röhrchen
SYBR Green PCR Master Mix	6,25 µl
miScript Universal Primer	1,25 µl
miScript Primer Assay	1,25 µl
cDNA	3,75 µl
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>12,5 µl</u>

4.1.8 Statistische Auswertung

Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde die snRNA RNU6-2 als endogene Referenz verwendet. Bei dieser relativen Quantifizierungsstrategie wird die Genexpression der Zielgene auf die benannte Kontrolle bezogen, um vergleichbare und reproduzierbare Daten zu generieren, die nicht durch Faktoren, wie RNA-Degradierung oder Unterschiede in der Probenverarbeitung bzw. Menge des Ausgangsmaterials, verfälscht wurden. Wichtigste Eigenschaft der verwendeten Kontrolle stellt deren stabile Expression in verschiedenen Geweben und Zelltypen dar.

Als Maß für die Quantifizierung der Menge an Ausgangsmaterial dient in der Echtzeit-PCR der sogenannte Ct-Wert (cycle threshold). Er entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, die notwendig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Die mittels Rotor Gene Q Series Software generierten Ct-Werte wurden zunächst in eine Microsoft-Excel-Tabelle importiert. In einem ersten Schritt wurde nun

für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens (RNU6-2) vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{RNU6})$$

Nach dieser Normierung wurde aus den infolge der Dreifachbestimmungen erhaltenen drei ΔCt -Werten je Probe der Mittelwert gebildet:

$$\overline{\Delta Ct} = \frac{\Delta Ct(1) + \Delta Ct(2) + \Delta Ct(3)}{3}$$

Die erhaltenen Mittelwerte wurden anschließend in zwei Gruppen aufgeteilt, jeweils für p53-mutierte und nicht-mutierte Proben. Mithilfe des Zweistichproben-t-Testes sollte nun errechnet werden, ob die Mittelwerte der beiden Grundgesamtheiten (μ_{mut} und μ_{WT}) ungleich sind (Alternativhypothese $H_1: \mu_{\text{mut}} \neq \mu_{\text{WT}}$) und damit signifikante Unterschiede zwischen der microRNA-Expression in p53-mutierten und nicht-mutierten Zelllinien bestehen. Für die Nullhypothese wurde demnach angenommen, dass die Mittelwerte der Grundgesamtheiten gleich sind ($H_0: \mu_{\text{mut}} = \mu_{\text{WT}}$). Der t-Test wurde über Microsoft Excel durchgeführt, die Ergebnisse anschließend grafisch dargestellt. Bei einem p-Wert (Signifikanzwert) von unter 0,05 sollte die Nullhypothese verworfen, die Expressionsunterschiede als statistisch signifikant angesehen werden.

4.2 Analyse der p53-Expression und p53-Zielgenexpression an Lungenkarzinomzelllinien

Neben der microRNA-Expression sollte in den Zelllinien zusätzlich die Expression von p53 sowie seiner Zielgene p21, PUMA, NOXA und BAX untersucht werden. Zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse wurde das Haushaltsgen GAPDH eingesetzt. Für einen Teil der Zelllinien (A549, NCI-H1975, NCI-H322 und NCI-H157) konnte auf bereits vorhandene Daten zurückgegriffen werden, die im Rahmen einer Masterarbeit am Institut für Pathologie erhoben worden waren.

4.2.1 Ausgangsmaterial

Für die Analyse der Expression von p53 bzw. seiner Zielgene konnte bereits vorhandene genomische DNA verwendet werden, die für ein anderes Projekt am Institut für Pathologie aus den Zelllinien extrahiert worden war.

4.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR

4.2.2.1 Verwendete Primer

Die Sequenzen der eingesetzten Primer-Paare für GAPDH, p53, p21, PUMA, NOXA und BAX sind in Tabelle 3 unter Abschnitt 3.3. aufgeführt.

4.2.2.2 Versuchsablauf

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde auf dem Rotor Gene Q (QIAGEN) durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden zunächst in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und zum Degradationsschutz auf Eis gelagert. Das Reaktionsgemisch wurde, wie in Tabelle 10 angegeben, hergestellt. Hierbei fand das FastStart Universal SYBR Green Master der Firma Roche (Basel, Schweiz) Verwendung. Pro Gen wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, die PCR erfolgte ferner in Dreifachansätzen. Das PCR-Programm gestaltete sich wie folgt: Nach einer initialen Inkubation von fünfzehnminütiger Dauer bei 95 °C wurde für 45 Zyklen bei jeweils 95 °C (15 Sekunden) und 60 °C (30 Sekunden) inkubiert.

Tabelle 10: qPCR-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen pro PCR-Röhrchen
FastStart Universal SYBR Green Master	6,25 µl
Forward Primer	0,375 µl
Reverse Primer	0,375 µl
RNase freies Wasser	3,00 µl
cDNA (1:5-verdünnt)	2,5 µl
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>12,5 µl</u>

4.2.3 Statistische Auswertung

Die Auswertung der über die Rotor Gene Q Series Software generierten Daten erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.1.8 beschrieben. Nach einer Normalisierung der PCR-Ergebnisse mithilfe des Kontrollgens GAPDH wurde die statistische Signifikanz der Expressionsunterschiede in Microsoft Excel über einen t-Test bestimmt.

4.3 p53-Mutations- und microRNA-Expressionsanalyse an primären Lungentumoren

Im Rahmen einer zweiten Versuchsreihe wurde die Expression der zuvor genannten microRNAs auch an primären Lungentumorgewebeproben mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht.

Zunächst sollte dabei der p53-Mutationsstatus der Tumorproben analysiert werden. Aus dem Tumorgewebe isolierte DNA wurde im Rahmen einer PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. Im Anschluss an die Aufreinigung der PCR-Produkte konnte die Sequenzierung erfolgen. Die Auswertung der Sequenz wurde durch einen Vergleich mit der Wildtyp-Sequenz des p53-Gens durchgeführt.

Anschließend konnte die microRNA-Expressionsanalyse erfolgen. Nach Isolierung von RNA aus den paraffineingebetteten Tumorproben wurden die weiteren Schritte

nach dem zuvor bereits beschriebenen Schema ausgeführt: Reverse Transkription zur cDNA-Synthese, quantitative Echtzeit-PCR und statistische Auswertung der PCR-Daten.

4.3.1 Ausgewählte Tumorproben

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 29 Restgewebeproben von Lungentumoren verwendet, die im Rahmen chirurgischer Eingriffe reseziert und über das Eingangslabor der Pathologie des Universitätsklinikums Charité Berlin als Paraffinblöcke asserviert worden waren. In zwanzig Fällen lag ein Adenokarzinom der Lunge vor. Die übrigen neun Proben wiesen ein Plattenepithelkarzinom auf.

Alle Patienten unterzogen sich bereits im Zeitraum zwischen 1995 – 1997 einer chirurgischen Operation aufgrund von Tumoren der Lunge an der chirurgischen Einrichtung der Charité Berlin. Eine neoadjuvante Chemo- bzw. Radiotherapie wurde bei keinem der Patienten durchgeführt.

Die Geschlechterverteilung gestaltete sich wie folgt: 70 % männliche Patienten, 30 % weibliche Patienten. Für das Alter lag die Untergrenze beim 18. Lebensjahr, die Obergrenze wurde auf 99 Lebensjahre festgesetzt.

Die Aufklärung bzw. das Einholen einer Einverständniserklärung eines jeden Patienten war aufgrund der großen Zeitspanne nicht möglich. Da gemäß der Berufsordnung für in Deutschland tätige Ärzte die Konsultation der zuständigen Ethik-Kommission bei Forschungsvorhaben mit Verwendung von Körpermaterialien obligat ist, fand vor Beginn dieser Versuchsreihe eine Beratung durch die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena statt. Gegen die geplanten Untersuchungen wurden keine ethischen oder berufsrechtlichen Bedenken erhoben. Das entsprechende Ethikvotum (Bearbeitungsnummer 5260-08/17) ist im Anhang zu finden.

4.3.2 p53-Mutationsanalysen

4.3.2.1 Ausgangsmaterial

Für die im Rahmen der Mutationsanalyse durchgeführte PCR konnte auf vorhandene genomische DNA zurückgegriffen werden, die zuvor bereits für eine Masterarbeit am Institut für Pathologie extrahiert worden war.

4.3.2.2 PCR

Mithilfe der PCR wurden zunächst relevante Abschnitte des p53-Gens amplifiziert. Da die überwiegende Mehrzahl der p53-Mutationen die DNA-bindende Region des p53-Proteins betrifft, wurden ausschließlich die für diese Domäne codierenden Exone 5 bis 8 des Gens analysiert. Der Reaktionsansatz wurde nach den Angaben in Tabelle 11 hergestellt. Zur Negativkontrolle wurde in jeder PCR ein DNA-freier Reaktionsansatz mitgeführt. Es wurden 4 Primer-Paare verwendet, deren Sequenzen unter Abschnitt 3.3 aufgeführt sind

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die PCR

Komponente	Volumen pro PCR-Röhrchen
Peqlab Reactionbuffer S	5 µl
Thermo Scientific dNTP Mix	5 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Template DNA	2 µl
Peqlab Hot Taq-DNA Polymerase	0,25 µl
H ₂ O	33,75 µl
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>50 µl</u>

Der Thermocycler (Peqlab Peqstar 96 Universal) wurde wie nachfolgend beschrieben programmiert: Auf die initiale Inkubation bei 95 °C für fünfzehn Minuten zur Aktivierung der Taq-DNA Polymerase folgten 38 Zyklen bestehend aus jeweils einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 45 Sekunden, einem Annealingschritt bei 57 °C für 45 Sekunden sowie einem Elongationsschritt bei 72 °C für eine Minute.

4.3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Der Erfolg der PCR wurde im Anschluss durch eine Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Zunächst wurde 1,5 %iger Agar (6 g Agar auf 400 ml Tris-EDTA-Acetat-Puffer) in der Mikrowelle aufgeköcht und in eine mit Gelschlitten und 10-well-Kamm vorbereitete Gelkammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gegossen. Nach einer Aushärtungszeit von 20 bis 25 Minuten wurde die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt und der Kamm entfernt. Als Referenz bzw. zum Größenvergleich wurde die erste Geltasche mit 5 µl DNA-Ladder (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) befüllt. In die übrigen Taschen wurde ein Gemisch aus 5 µl des PCR-Produktes und 1 µl DNA-Ladepuffer (DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) pipettiert. Anschließend wurde die DNA für 60 Minuten bei 100 V aufgetrennt. Nach Ablauf der Zeit wurde mittels Gel Red gefärbt und die Banden in einer UV-Kammer (FluorChem FC2 Imaging System, Biozym) beurteilt und fotografisch dokumentiert.

4.3.2.4 DNA-Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung

In Vorbereitung auf die Sequenzierung erfolgte die Aufreinigung und Konzentrierung der PCR-Produkte mithilfe des DNA Clean & Concentrator-5 Kits (ZymoResearch, Irvine, USA) gemäß Protokoll des Herstellers. Zu 45 µl der Nucleinsäurelösung wurde das doppelte Volumen DNA Binding Buffer (90 µl) gegeben und das Gemisch anschließend in eine Säule pipettiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 g für eine Minute wurde der Überstand verworfen und zweimalig mit 200 µl Wash Buffer gewaschen. Durch Zugabe von 11 µl Wasser und erneute Zentrifugation bei 12.000 g wurde die DNA in ein neues Zentrifugenröhrchen eluiert.

Konzentration und Reinheit der Nucleinsäurelösung wurden im Anschluss spektrophotometrisch mittels NanoDrop 1000 kontrolliert. Bei einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis von mindestens 1,8 und einer DNA-Konzentration von über 80 ng/μl wurde ein Probenvolumen entsprechend 100 ng/μl DNA in jeweils zwei Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Hinzugabe von 2 μl Primer (Forward- und Reverse Primer) konnten die PCR-Produkte zur Sequenzierung nach Sanger an die Firma Source Bioscience (Berlin, Deutschland) geschickt werden.

4.3.2.5 Sanger-Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen

Die Sanger-Sequenzierung der Proben wurde durch die Firma Source Bioscience durchgeführt. Diese auch als Didesoxymethode bekannte Variante der Sequenzierung basiert auf dem DNA-Polymerase-vermittelten Einbau spezieller fluoreszenzfarbstoffmarkierter Nukleotide, die aufgrund des Fehlens der Hydroxylgruppe am 3'-Ende (Didesoxynukleosidtriphosphate) zu einem Abbruch der DNA-Synthese führen. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich markierte Teilkopien des zu untersuchenden DNA-Abschnittes, die anschließend in der Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Mithilfe eines Detektors und computergestützter Analyse können die erhaltenen Daten in eine Genomsequenz übersetzt werden.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte anschließend mit Hilfe der Software FinchTV (Geospiza, Version 1.4). Hierfür wurden die jeweiligen Chromatogramme der durch Forward- und Reverse-Primer generierten Sequenzen auf mutationsverdächtige Veränderungen abgesucht. Durch einen Vergleich mit der Wildtyp-Sequenz des p53-Gens via BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Version 2.6.0) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurden die Ergebnisse validiert.

4.3.3 microRNA-Expressionsanalyse

4.3.3.1 RNA-Isolierung aus Paraffinblöcken

Zur Isolierung von RNA aus den paraffineingebetteten Tumorproben wurde das miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN) eingesetzt. Zunächst wurden am Mikrotom zwei bis drei maximal 20 µm dicke Paraffinschnitte erstellt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Hinzugabe von 160 µl Deparaffinization Solution (QIAGEN) und kräftigem Vortexen wurden die Schnitte entparaffiniert. Die Lösung wurde anschließend mit 150 µl Buffer PKD und 10 µl Proteinase K versetzt und für jeweils fünfzehn Minuten bei 56 °C und 80 °C inkubiert, um die RNA aus den Gewebeproben freizusetzen sowie formaldehydbedingte Veränderungen der Nucleinsäuren teilweise aufzuheben. Die untere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert und für drei Minuten auf Eis gelagert, anschließend für fünfzehn Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 16 µl DNase Booster Buffer und 10 µl DNase I versetzt. Die Behandlung mit DNase diente im Wesentlichen der Eliminierung genomischer DNA, einschließlich kurzer DNA-Fragmente, die typischerweise in FFPE-Proben zu finden sind und Folge der Formalinfixierung bzw. langen Aufbewahrung der Proben darstellen. Nach einem weiteren fünfzehnminütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur wurde die Probe mit 320 µl des RBC-Buffers und 1120 µl Ethanol (100 %) versetzt. Das Gemisch wurde nun schrittweise in die mitgelieferte Säule (RNeasy Mini Spin Column) pipettiert und bei 8.000 g für 20 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen, während die isolierte RNA an die Säulenmembran gebunden wurde. Durch zweimaliges Waschen mit je 500 µl Buffer RPE wurden Kontaminationen entfernt. Anschließendes fünfminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit diente dem Trocknen der Säulenmembran, um eine Verunreinigung des Eluats mit Ethanol zu vermeiden. Durch Hinzugabe von 20 µl Wasser in die Säule und erneuter Zentrifugation für eine Minute wurde die RNA in ein neues Zentrifugenröhrchen eluiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Aufbewahrung der RNA-Proben bei -20 °C im Gefrierschrank.

4.3.3.2 Reverse Transkription

Nach Bestimmung von RNA-Konzentration und Reinheit der Proben im Spektrophotometer wurde die Reverse Transkription zur cDNA-Synthese analog zu den bereits unter 4.1.6 beschriebenen Schritten unter Einsatz des miScript II RT Kits (QIAGEN) durchgeführt.

4.3.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Der Ablauf der quantitativen Echtzeit-PCR mithilfe des miScript SYBR Green PCR Kits und den bereits vorgestellten Primer Assays gestaltete sich wie unter 4.1.7 dargelegt.

4.3.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der PCR-Daten erfolgte nach der an anderer Stelle (Abschnitt 4.1.8) ausführlich beschriebenen Methode.

5 ERGEBNISSE

5.1 microRNA-Expressionsanalyse in Lungenkarzinomzelllinien

Im Verlauf der ersten Versuchsreihe sollten die Expressionsmuster 11 ausgewählter microRNAs an humanen epithelialen Lungenkarzinomzelllinien in Abhängigkeit des p53-Mutationsstatus untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst in der Monolayer-Kultur gezüchtet und bei Erreichen einer 70 bis 90 %igen Konfluenz geerntet. Nach Isolierung der RNA aus den Zellpellets und Umschreiben in cDNA mittels Reverser Transkription wurde die microRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Die Normalisierung der PCR-Daten erfolgte mithilfe der snRNA RNU6-2, anschließend wurde aus den je Probe und Gen erhaltenen ΔCt -Werten der Mittelwert gebildet. Nach Zuordnung dieser Werte in die jeweilige Gruppe (p53-Wildtyp und p53-Mutante) wurde erneut das arithmetische Mittel ($\overline{\Delta\text{Ct}}$) der beiden Grundgesamtheiten berechnet. Über den Zweistichproben-t-Test wurde anschließend bestimmt, ob zwischen den Ct-Werten der p53-mutierten und nicht-mutierten Zelllinien statistisch signifikante Unterschiede bestehen. Die so generierten Werte sind nachstehend tabellarisch (Tabelle 12) und grafisch (Abbildung 8) dargestellt.

Der Ct-Wert ist definiert als die Anzahl der PCR-Zyklen, die notwendig sind, damit das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Grenzwert (threshold) überschreitet. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zur Menge der Ribonukleinsäuren in der Ausgangsprobe. Niedrige Ct-Werte entsprechen daher einer hohen DNA-Konzentration im Untersuchungsmaterial und weisen damit auf eine starke Expression des jeweiligen Zielgens hin.

Tabelle 12: microRNA-Expressionsmuster in Lungenkarzinomzelllinien. Die p53-Wildtyp-Zelllinien beinhalten A549, H2030, H1650; zur Gruppe der p53-mutierten Zelllinien gehören H23, H157, H2170 und H322. Statistische Signifikanz bei $p < 0,05$. $\Delta\overline{Ct}$ – Mittelwert der ΔCt -Werte. SE – Standardfehler des Mittelwertes. p-Wert – Signifikanzwert.

microRNA	p53-Wildtyp		p53-Mutante		p-Wert	Signifikanz
	$\Delta\overline{Ct}$	SE	$\Delta\overline{Ct}$	SE		
Hsa-miR-18a-5p	3,94	1,57	4,73	0,74	0,62	nein
Hsa-miR-23a-5p	8,11	1,83	9,37	0,37	0,43	nein
Hsa-miR-1285-3p	5,08	2,01	7,93	1,15	0,22	nein
Hsa-miR-141-3p	4,69	3,43	7,35	2,24	0,51	nein
Hsa-miR-15a-3p	11,37	4,02	9,42	1,15	0,59	nein
Hsa-miR-380-5p	9,74	2,78	12,07	0,92	0,34	nein
Hsa-miR-504-5p	13,04	3,25	14,08	1,14	0,73	nein
Hsa-miR-200a-3p	9,66	3,46	10,00	1,77	0,93	nein
Hsa-miR-25-3p	3,97	2,19	5,77	1,28	0,47	nein
Hsa-miR-30d-5p	3,32	1,98	4,68	0,75	0,48	nein
Hsa-miR-518c-5p	11,45	1,86	13,07	0,74	0,38	nein

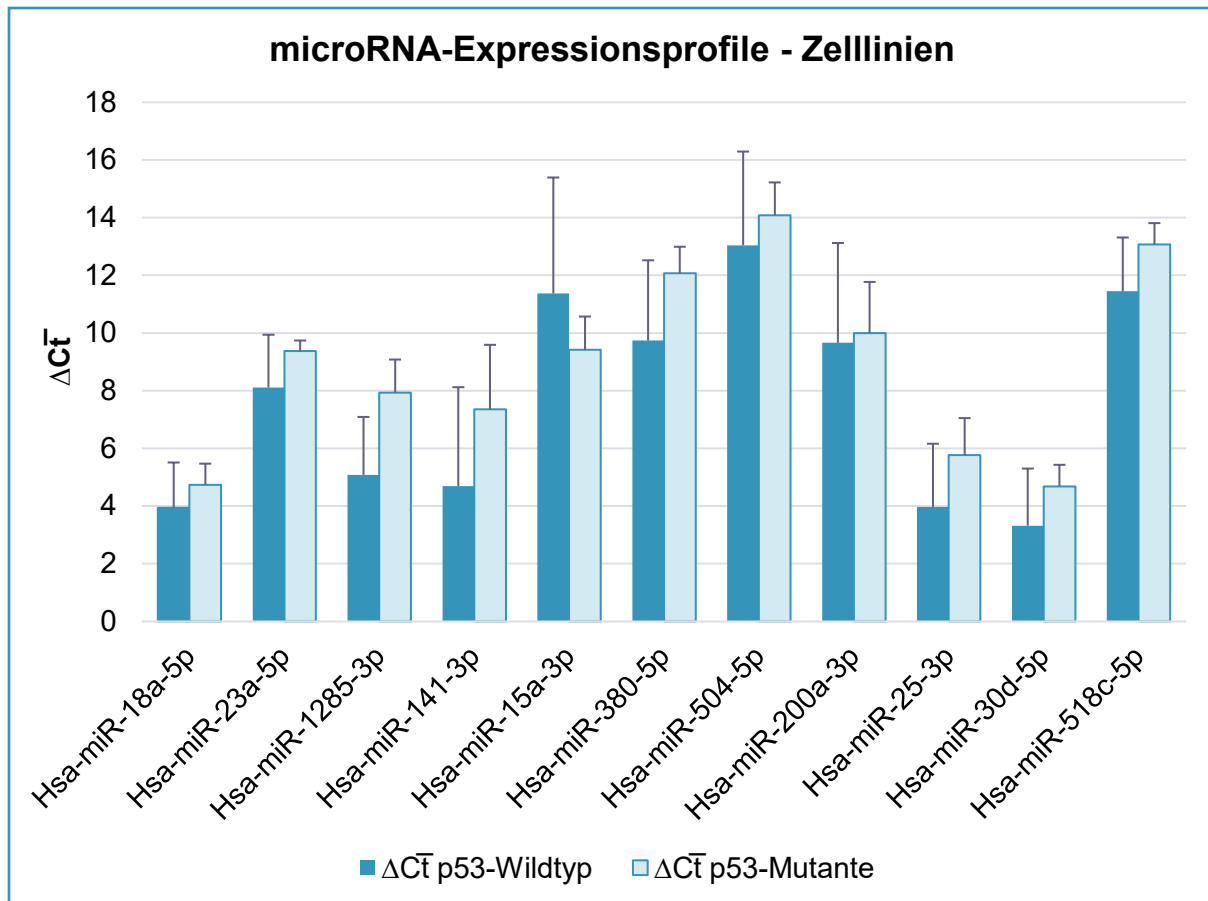


Abbildung 8: microRNA-Expressionsprofile in Lungenkarzinomzelllinien. Die Expression von 11 microRNAs wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR in 7 Lungenkarzinomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Mutationsstatus analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichung. Die snRNA RNU6-2 wurde als Kontrolle verwendet. $\Delta\overline{Ct}$ – Mittelwert der $\Delta\overline{Ct}$ -Werte.

Die deutlichsten Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Tumorzelllinien zeigten sich bei den microRNAs hsa-miR-1285-3p (p-Wert 0,22), hsa-miR-380-5p (p-Wert 0,34) sowie hsa-miR-518c-5p (p-Wert 0,38). Eine statistische Signifikanz (p-Wert < 0,05) bezüglich der Expressionsunterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ergab sich jedoch für keine der untersuchten microRNAs.

5.2 Analyse der p53-Expression und p53-Zielgenexpression an Lungenkarzinomzelllinien

In den Lungenkarzinomzelllinien wurde des Weiteren die Expression von p53 und seiner Zielgene p21, PUMA, NOXA und BAX ermittelt. P21 stellt eine der Hauptzielstrukturen von p53 dar und vermittelt unter anderem einen Zellzyklusarrest nach Detektion von DNA-Schäden im Genom der Zelle. Bei PUMA, NOXA und BAX handelt es sich um Apoptose-assoziierte Gene, die durch p53 reguliert werden.

Ausgehend von bereits vorhandener genomischer DNA wurde die quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Das Haushaltsgen GAPDH diente der Normalisierung der Expressionsergebnisse. Die erhobenen Daten sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Eine entsprechende grafische Darstellung findet sich in Abbildung 9.

Tabelle 13: p53-Expression und p53-Zielgenexpression an Lungenkarzinomzelllinien. Die p53-Wildtyp-Zelllinien beinhalten A549, H2030, H1650; zur Gruppe der p53-mutierten Zelllinien gehören H23, H157, H2170 und H322. Statistische Signifikanz bei $p < 0,05$. ΔC_t – Mittelwert der ΔC_t -Werte. SE – Standardfehler des Mittelwertes. p-Wert – Signifikanzwert.

	p53-Wildtyp		p53-Mutante		p-Wert	Signifikanz
	ΔC_t	SE	ΔC_t	SE		
p53	11,06	1,83	11,30	1,17	0,91	nein
p21	4,84	0,55	6,70	0,72	0,12	nein
PUMA	10,35	1,56	10,89	1,37	0,81	nein
NOXA	6,86	0,27	5,44	0,76	0,22	nein
BAX	5,41	0,50	5,61	0,62	0,83	nein

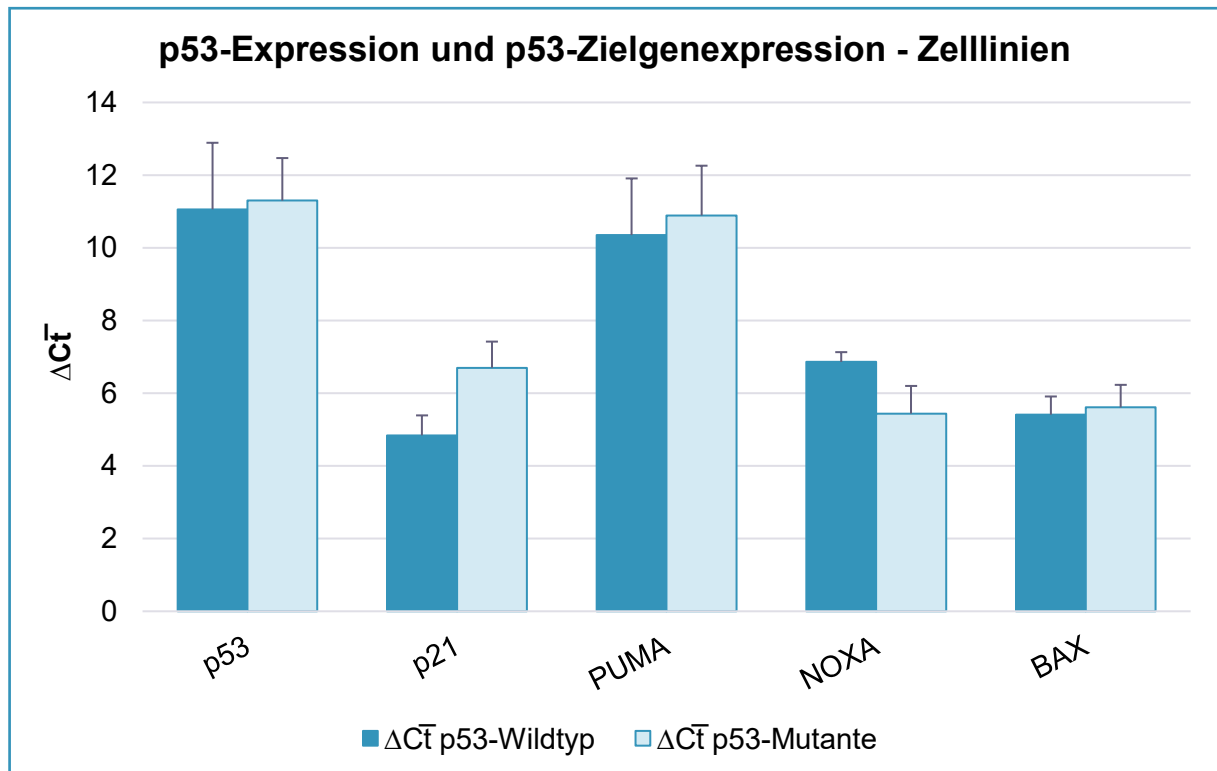


Abbildung 9: p53-Expression und p53-Zielgenexpression in Zelllinien. Die mRNA-Expression der p53-Zielgene einschließlich p21, PUMA, NOXA und BAX wurde mittels qPCR analysiert. Die grafische Darstellung spiegelt die Daten aus den Mittelwerten der Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichung wider. GAPDH wurde als Kontrolle eingesetzt. ΔC_t – Mittelwert der ΔC_t -Werte.

Das Zielgen p21 ist in Tumorzelllinien ohne p53-Mutation tendenziell höher exprimiert. Der umgekehrte Fall ergibt sich für NOXA, das in Zellen mit nachgewiesener p53-Mutation durchschnittlich niedrigere Ct-Werte und damit eine stärkere Expression aufweist. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) der Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und Mutanten-Gruppe zeigte sich jedoch nicht.

5.3 p53-Mutationsanalyse an primären Lungentumoren

Die p53-Mutationsanalysen der Exone 5 bis 8 ergaben für insgesamt 11 der 29 untersuchten primären Lungentumoren Mutationen des p53-Gens. Die übrigen 18 Patientenproben zeigen in diesen Bereichen die Wildtyp-Sequenz. Tabelle 14 fasst die gefundenen Mutationen zusammen, in den Abbildungen 10 bis 12 sind die entsprechenden Sequenzen dargestellt.

Tabelle 14: Ergebnis der p53-Mutationsanalysen der positiv getesteten (mutierten) Fälle.

Probennummer	Tumorentität	Mutation
19388	Adenokarzinom	p.R249S
23440	Adenokarzinom	p.C176F
3659	Adenokarzinom	p.R273L
10031	Adenokarzinom	p.G185D
22290	Adenokarzinom	p.M237T
24600	Adenokarzinom	p.S166X
8932	Plattenepithelkarzinom	p.R273L
16456	Plattenepithelkarzinom	p.Q192del
8418	Plattenepithelkarzinom	p.M237I
10970	Plattenepithelkarzinom	p.V218dup
13597	Plattenepithelkarzinom	p.R273L

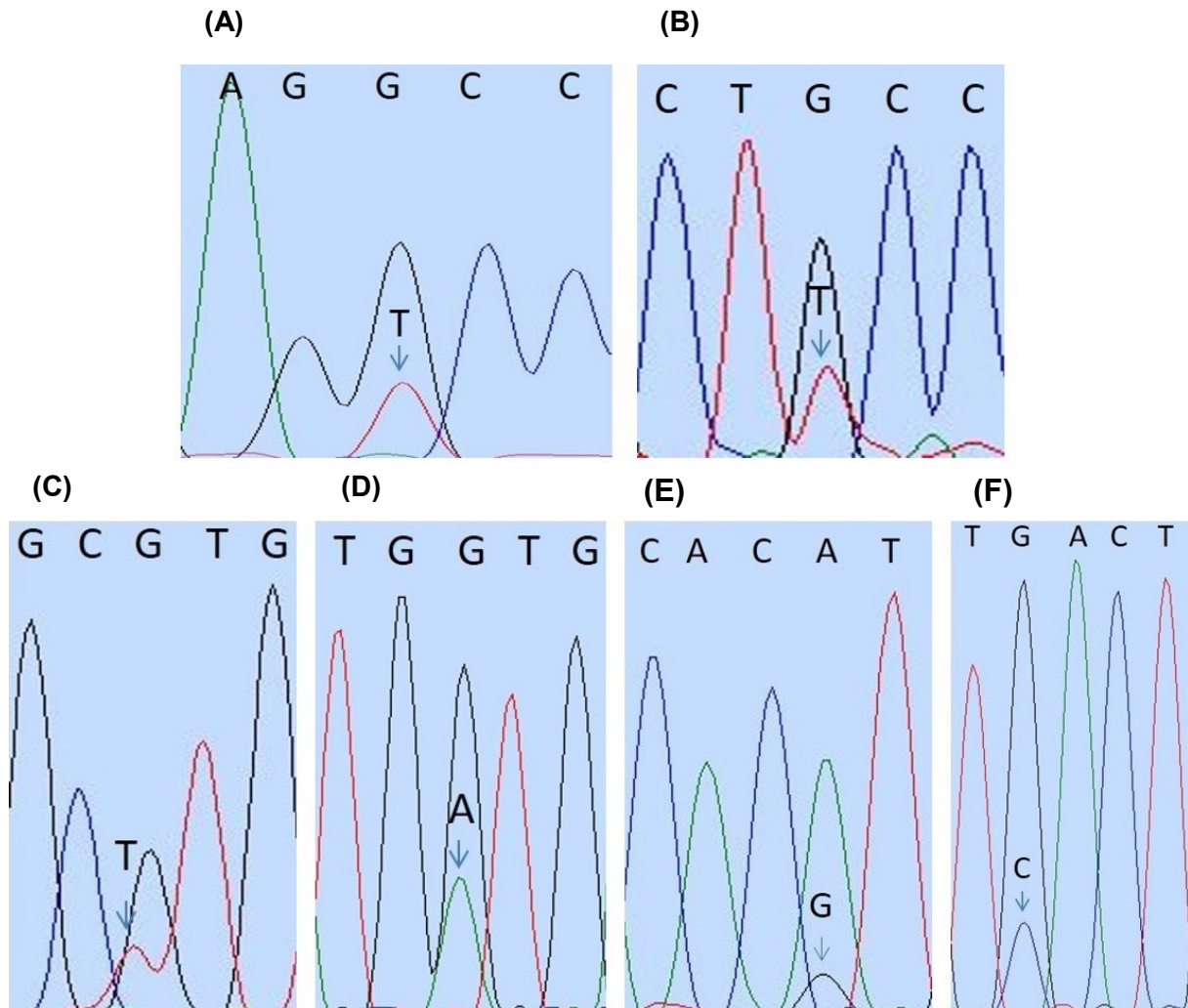


Abbildung 10: Ergebnis der p53-Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung der glandulär differenzierten Tumorproben (Adenokarzinome). (A) Probe 19388 (p.R249S) [Forward-Sequenz], (B) Probe 23440 (p.C176F) [Forward-Sequenz], (C) Probe 3659 (p.R273L) [Forward-Sequenz], (D) Probe 10031 (p.G185D) [Forward-Sequenz], (E) Probe 22290 (p.M237L) [Reverse-Sequenz], (F) Probe 24600 (p.S166X) [Reverse-Sequenz]. A – Adenin. C – Cytosin. G – Guanin. T – Thymin.

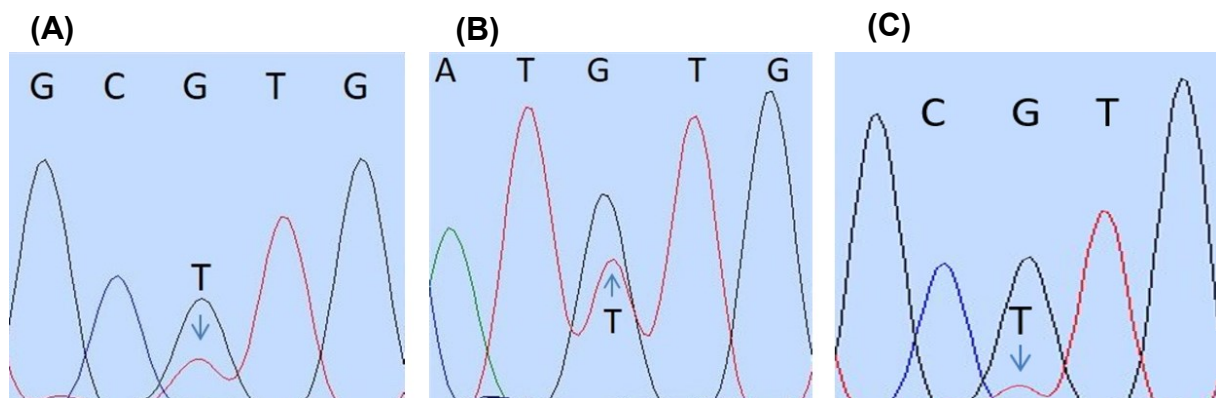


Abbildung 11: Ergebnis der p53-Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung der Plattenepithelkarzinome. (A) Probe 8932 (p.R273L) [Forward-Sequenz], (B) Probe 8418 (p.M237I) [Forward-Sequenz], (C) Probe 13597 (p.R273L) [Forward-Sequenz]. A – Adenin. C – Cytosin. G – Guanin. T – Thymin.

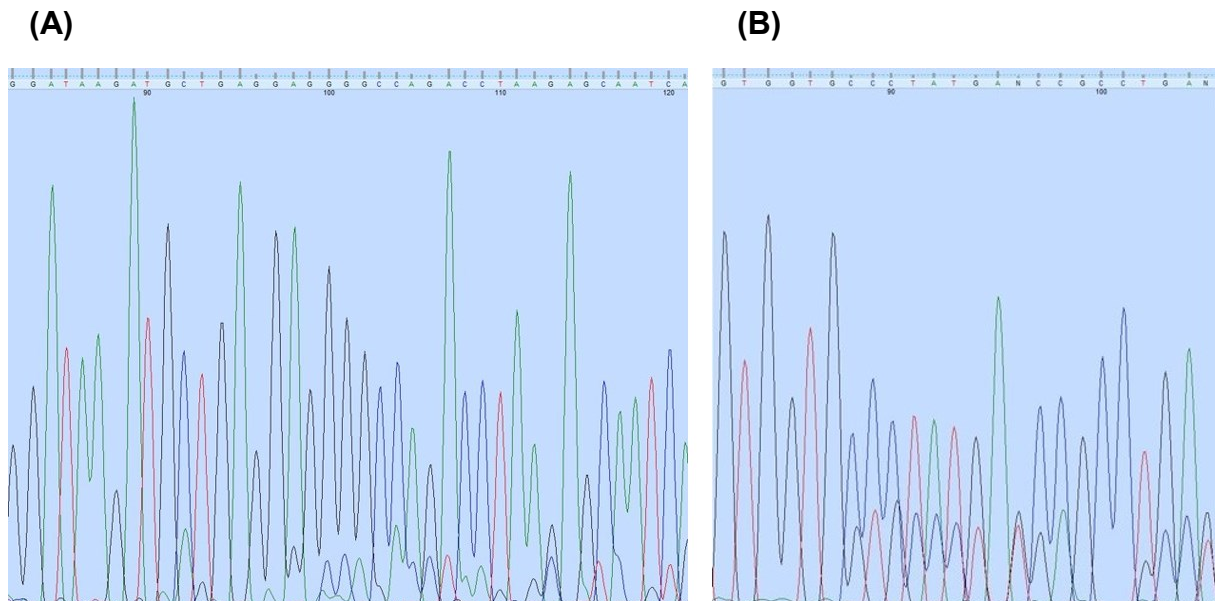


Abbildung 12: Ergebnis der p53-Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung der Plattenepithelkarzinome. (A) Probe 16456 (p.Q192del) [Reverse-Sequenz], (B) Probe 10970 (p.V218dup) [Forward-Sequenz]. A – Adenin. C – Cytosin. G – Guanin. T – Thymin.

Vier der Mutationen wurden in besonders häufig veränderten „Hotspot“-Bereichen (R249, R273) des p53-Gens nachgewiesen (Rivlin et al. 2011). Drei der Proben zeigen hierbei dieselbe Missense-Mutation des R273-„Hotspots“. Die gefundenen Genveränderungen werden im Folgenden kurz charakterisiert.

Probe 19388 – p.R249S

Diese Tumorprobe weist eine Missense-Mutation im Codon 249 des Exons 7 auf. Der Austausch der Base Guanin gegen Thymin bewirkt dabei die Expression der Aminosäure Serin statt Arginin. Das p53-Gen zeigt im Sinne eines „Hotspots“ in dieser Lokalisation besonders häufig Veränderungen. In der Literatur sind für diese Mutation gain-of-function-Charakteristika beschrieben, unter anderem durch die Förderung der Tumormigration und Proliferation (Muller und Vousden 2014).

Probe 23440 – p.C176F

Eine Punktmutation in Codon 176 (Exon 5) führt hier zu einem Austausch der Aminosäure Cystein gegen Phenylalanin. Es handelt sich um eine Mutation, die dem p53-Protein onkogene Eigenschaften verleiht (Muller und Vousden 2014).

Probe 3659 – p.R273L

Diese „Hotspot“-Mutation in Codon 273 des Exons 8 verursacht den Einbau der Aminosäure Leucin statt Arginin. Grundlage ist der Ersatz der Base Guanin durch Thymin.

Probe 10031 – p.G185D

Die Substitution der Base Guanin durch Adenin in Exon 5 (Codon 185) im Sinne einer Missense-Mutation bewirkt die Expression von Asparaginsäure statt Glycin.

Probe 22290 – p.M237T

Für diese Mutation in Codon 237 des Exons 7 wurden in Zellkulturexperimenten bereits protumorige Eigenschaften nachgewiesen (Wang et al. 2014). Die veränderte Basensequenz (ATG>ACG) codiert für Threonin, anstatt wie ursprünglich für Methionin.

Probe 24600 – p.S166X

Diese Nonsense-Mutation kommt durch einen Basenaustausch in Codon 166 des Exons 5 zustande (TCA>TGA).

Probe 8932 – p.R273L

Bei dieser Tumorprobe eines Plattenepithelkarzinoms liegt die bereits zuvor beschriebene „Hotspot“-Mutation in Codon 273 vor.

Probe 16456 – p.Q192del

Das Exon 6 des p53-Gens weist hier eine Deletion in Codon 192 auf.

Probe 8418 – p.M237I

Erneut zeigt sich eine Punktmutation in Codon 237 des Exons 7. Durch den Ersatz von Guanin gegen Thymin kommt es hier jedoch zum Austausch der Aminosäure Methionin durch Isoleucin.

Probe 10970 – p.V218dup

Im Bereich des Codons 218 (Exon 6) wurde eine Duplikation gefunden.

Probe 13597 – p.R273L

Auch diese Probe weist eine Missense-Mutation des Codons 273 (Exon 8) mit einem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Leucin auf.

5.4 microRNA-Expressionsanalyse an primären Lungentumoren

Im Mittelpunkt der zweiten Versuchsreihe stand die Frage, ob sich relevante microRNA-Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten primären Lungentumoren nachweisen lassen. Aus paraffineingebetteten Restgewebeproben wurde zunächst RNA isoliert und anschließend in cDNA transkribiert. Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR für die 11 untersuchten microRNAs sind in Tabelle 15 und Abbildung 13 aufgeführt.

Tabelle 15: microRNA-Expressionsmuster in primären Lungentumoren. Die p53-Wildtyp-Gruppe umfasst 18 Proben; die p53-Mutanten-Gruppe beinhaltet 11 Proben. Statistische Signifikanz bei $p < 0,05$. $\Delta\bar{Ct}$ – Mittelwert der ΔCt -Werte. SE – Standardfehler des Mittelwertes. p-Wert – Signifikanzwert.

microRNA	p53-Wildtyp		p53-Mutante		p-Wert	Signifikanz
	$\Delta\bar{Ct}$	SE	$\Delta\bar{Ct}$	SE		
Hsa-miR-18a-5p	6,83	0,25	6,97	0,3	0,73	nein
Hsa-miR-23a-5p	11,27	0,24	11,11	0,27	0,67	nein
Hsa-miR-1285-3p	6,83	0,22	6,89	0,33	0,87	nein
Hsa-miR-141-3p	3,68	0,28	3,68	0,28	0,99	nein
Hsa-miR-15a-3p	9,01	0,22	8,64	0,25	0,29	nein
Hsa-miR-380-5p	12,23	0,24	12,05	0,29	0,65	nein
Hsa-miR-504-5p	11,87	0,16	11,70	0,26	0,56	nein
Hsa-miR-200a-3p	5,61	0,21	6,64	0,68	0,10	nein
Hsa-miR-25-3p	5,07	0,18	4,99	0,23	0,77	nein
Hsa-miR-30d-5p	4,27	0,27	4,12	0,27	0,72	nein
Hsa-miR-518c-5p	10,97	0,15	10,84	0,30	0,66	nein

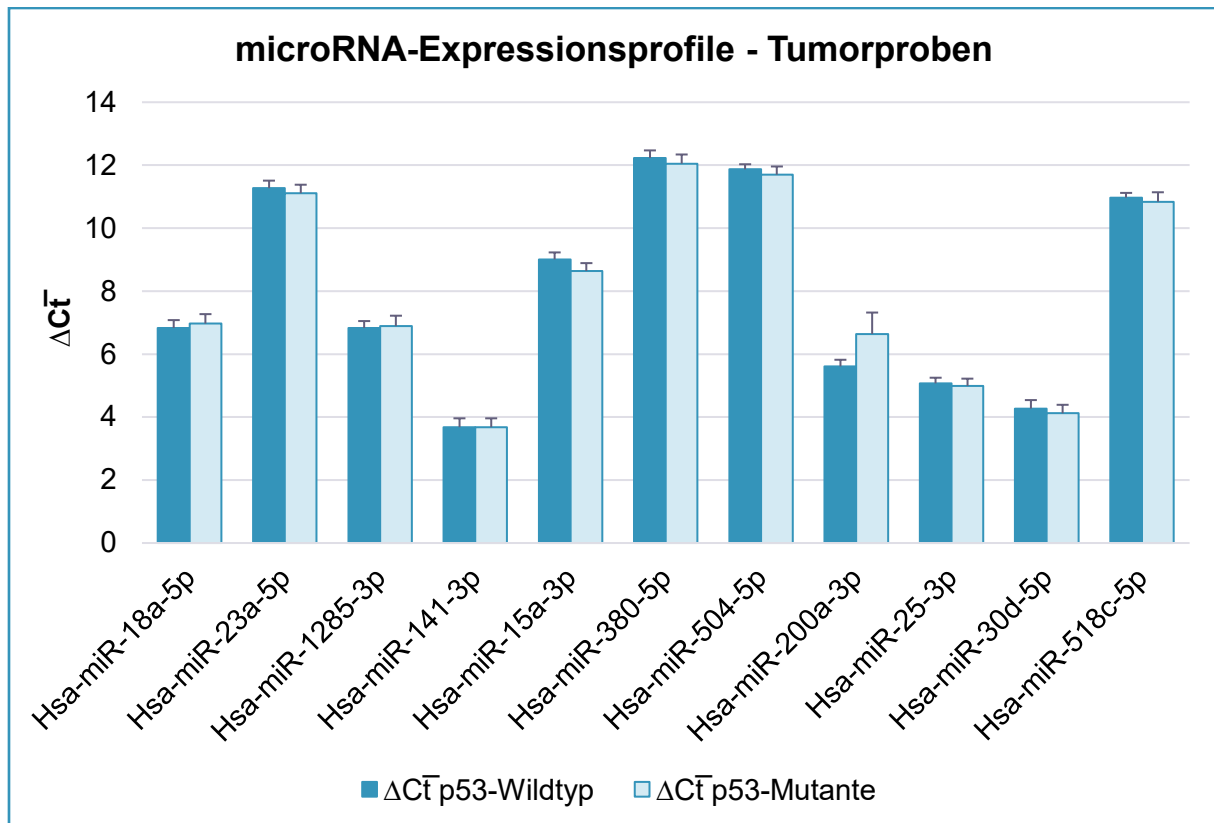


Abbildung 13: microRNA-Expressionsprofile in primären Lungentumoren. Die Expression von 11 microRNAs wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR in 29 Patientenproben mit unterschiedlichem p53-Mutationsstatus analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichung. Die snRNA RNU6-2 wurde als Kontrolle verwendet. ΔC_t – Mittelwert der ΔC_t -Werte.

Die deutlichsten Expressionsunterschiede zwischen p53-Wildtyp- und Mutanten-Gruppe zeigten sich bei den microRNAs hsa-miR-200a-3p (p-Wert 0,10) sowie hsa-miR-15a-3p (p-Wert 0,29). Durchschnittlich nahezu identische Ct-Werte ergaben sich für die microRNA hsa-miR-141-3p (p-Wert 0,99). Eine statistische Signifikanz der abweichenden Expressionsmuster zeigte sich bei keiner der analysierten Ribonukleinsäuren.

6 DISKUSSION

6.1 Überblick

Eine Fehlfunktion des p53-Tumorsuppressorgens gilt heute als unabdingbar für die Entstehung maligner Tumoren. Dennoch weisen lediglich rund 50 % aller bösartigen Neoplasien Mutationen dieses Gens auf. Eine Inaktivierung von p53 ist auch auf anderen, indirekten Wegen möglich, beispielsweise über die Amplifizierung des MDM2-Gens oder eine Hemmung des Tumorsuppressors durch virale Proteine. Ein Großteil der Mechanismen, die zum Ausfall der p53-Funktion führen, ist jedoch nach wie vor unbekannt. Mit der Entdeckung der microRNAs als zentrale Regulatoren der Genexpression wurde das Arsenal der p53-Mit- und Gegenspieler um unzählige potentielle Einflussnehmer erweitert. Die Steuerung der Genexpression von p53 durch microRNAs erfolgt posttranskriptionell über eine direkte Interaktion mit dem 3'-untranslatierten Bereich der p53-mRNA. Durch die Beeinflussung von Prozessen wie Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz können diese nichtcodierenden Ribonukleinsäuren somit auch für die Onkogenese eine wichtige Rolle spielen. Die Interaktion zwischen microRNAs und p53 ist dabei jedoch nicht unidirektional. Auch der umgekehrte Fall – die Einflussnahme von p53 auf microRNAs, unter anderem über die Einbindung in deren Biogenese oder die Regulation ihrer Expression – wurde bereits mehrfach dargelegt. Über rückkoppelnde Effekte auf die p53-Stabilität und -Aktivität im Sinne von Feedback-Mechanismen ergibt sich so ein komplexes regulatorisches Netzwerk. Die Bestimmung des p53-Mutationsstatus in Kombination mit der Analyse der microRNA-Expressionslevel könnte daher wichtige Informationen im Hinblick auf Diagnostik und Prognose maligner Erkrankungen liefern. Durch die Manipulation der microRNA-Spiegel in menschlichen Tumoren erhofft man sich zudem neue therapeutische Strategien.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Zusammenspiel zwischen 11 microRNAs und dem Tumorsuppressorgen p53 in Lungentumorzelllinien und Proben primärer Bronchialkarzinome untersucht werden. Für die ausgewählten microRNAs ist bereits eine funktionelle Assoziation zum p53-Gen nachgewiesen worden. Teilweise kommt es zur Aktivierung der microRNAs auf Transkriptionsebene durch p53 nach Detektion von Schäden im Genom der Zelle, beispielsweise bei miR-15a und miR-23a (Suzuki et al. 2009). Andere microRNAs werden im Sinne einer positiven Feedback-Schleife

durch p53 reguliert, wie miR-141, miR-25, miR-200a, miR-518c und miR-18a (Kim et al. 2011, Suh et al. 2012 und Jing et al. 2015). Die übrigen Ribonukleinsäuren spielen wiederum eine Rolle bei der Regulation von Prozessen wie Zellzyklus, Apoptose und zellulärem Überleben durch eine Interaktion mit p53, darunter miR-380, miR-504 und miR-1285 (Swarbrick et al. 2010, Hu et al. 2010, Tian et al. 2010 und Kumar et al. 2011). Neben der p53-Mutationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung wurde insbesondere die Technik der Polymerase-Kettenreaktion zur Ermittlung der microRNA-Expressionslevel eingesetzt. Ziel war die Klärung der Fragestellung, ob relevante Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Zelllinien bzw. Tumorproben feststellbar sind. Dadurch sollte insbesondere ein Beitrag zum besseren Verständnis der an der Onkogenese beteiligten Prozesse geleistet werden.

6.2 microRNA-Expressionsunterschiede im Zellkulturmodell

Die Expressionsanalyse der nichtcodierenden Ribonukleinsäuren im Zellkulturmodell ergab tendenziell niedrigere ΔC_T -Werte und damit eine höhere microRNA-Expression in Zelllinien mit Wildtyp-Konformation des p53-Gens. Besonders deutliche Unterschiede zwischen mutierter und nicht-mutierter Gruppe zeigten die microRNAs hsa-miR-1285-3p, hsa-miR-380-5p und hsa-miR-518c-5p. Eine statistische Signifikanz der Expressionsunterschiede ($p < 0.05$) war jedoch für keine der untersuchten Ribonukleinsäuren ablesbar. Nahezu identische ΔC_T -Werte für p53-mutierte und nicht-mutierte Zelllinien wies die microRNA hsa-miR-200a-3p auf. Gesicherte Hinweise auf eine unterschiedliche Beeinflussung der microRNA-Expression je nach p53-Mutationsstatus ergaben sich im Zellkulturmodell demzufolge nicht.

Eine Studie durch Suzuki et al. aus dem Jahr 2009 lieferte für die microRNAs miR-15a und miR-23a im Zellkulturmodell abweichende Ergebnisse. Hierbei sollte die Beeinflussung der microRNA-Prozessierung durch p53 untersucht werden. Zur Identifizierung potentieller, durch p53 regulierter microRNAs wurden zunächst die Expressionslevel verschiedener Ribonukleinsäuren in HCT116-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin, einem p53-induzierenden Medikament, mittels

quantitativer Echtzeit-PCR ermittelt. Es ergab sich, dass neben der bereits als p53-Ziel bekannten microRNA miR-34a auch zahlreiche weitere microRNAs, darunter miR-15a und miR-23a hochreguliert wurden. Um zu bestimmen, ob dieser Anstieg transkriptionell oder auf posttranskriptioneller Ebene vermittelt wird, wurden die Expressionsspiegel der Vorläufer (pri- und pre-miRNAs) sowie der reifen Formen gemessen. Während miR-34a als direktes transkriptionelles Ziel von p53 eine Erhöhung aller Formen zeigte, wiesen die anderen microRNAs keine Veränderungen bezüglich der primären Transkripte, wohl aber einen Anstieg der pre-miRNAs und reifen microRNAs auf. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei der Untersuchung zweier weiterer humaner Zelllinien (WI-38 und TIG-3) und der Ovarialkarzinomzelllinie TOV12G. In einem nächsten Schritt wurden schließlich die Einflüsse verschiedener transkriptionell inaktiver p53-Mutanten (C135Y, R175H, R273H) auf die microRNA-Prozessierung in HCT116-Zellen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass bei p53-Mutation die Produktion der pre-miRNAs und reifen microRNAs verringert war, während die pri-miRNA-Spiegel keine Beeinflussung zeigten. Die Akkumulation von mutiertem p53 behinderte ferner die Interaktion der Ribonuklease DROSHA mit p68, zwei für die microRNA-Prozessierung essenziellen Molekülen. Die Expression der Wildtyp-Form von p53 induziert hingegen einen leichten Anstieg der DROSHA-p68-Interaktion. RNA-ChIP-Analysen bewiesen zudem eine Reduzierung der Assoziation zwischen den pri-miRNAs und dem p68-DROSHA-Komplex. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass das mutierte p53-Gen die microRNA-Biogenese und Prozessierung in einem transkriptionsabhängigen Prozess unterdrückt. (Suzuki et al. 2009)

Eine durch Zhang et al. festgestellte weitgehende Herabregulierung der microRNAs in high-grade Ovarialkarzinomen mit einer hohen Rate an p53-Mutationen und p53-Überexpression untermauert diese These zusätzlich (Zhang et al. 2008).

Dass sich im Rahmen dieser Arbeit abweichende Ergebnisse für die untersuchten microRNAs ergaben, ist auf verschiedene Gründe zurückzuführen, die später näher erörtert werden sollen.

6.3 p53-Expression und p53-Zielgenexpression in Abhängigkeit des Mutationsstatus

Zur Untersuchung der potentiellen Beeinflussung des Tumorsuppressorgens p53 in Abhängigkeit seines Mutationsstatus durch microRNAs wurden die Expressionsmuster von p53 selbst und seiner Zielgene p21, PUMA, NOXA und BAX in Zellkulturen bestimmt. Hierbei ergab sich, dass das Zielgen p21 in Tumorzelllinien ohne p53-Mutation tendenziell höher exprimiert zu sein scheint, während NOXA in Zellen mit nachgewiesener p53-Mutation eine durchschnittlich stärkere Expression zeigt. Eine statistische Signifikanz für diese Ergebnisse konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Expressionsuntersuchung des p53-Gens lieferte nahezu identische Werte für beide Gruppen. Eine verminderte Expression von p53 bzw. seiner Zielgene in einer der beiden Gruppen hätte ein Hinweis auf eine vom Mutationsstatus abhängige Beeinflussung durch microRNAs sein können.

Zwei der untersuchten Ribonukleinsäuren wurden bereits 2011 als Einflussnehmer auf das p53-Tumorsuppressorgen entdeckt. Durch Analysen an Plasmazellen gesunder und am Multiplen Myelom erkrankter Probanden wurde gezeigt, dass miR-30d und miR-25 mit der 3'-untranslatierten Region der p53-mRNA interagieren und so eine Verminderung der Expression von p53 und seiner Zielgene p21, PUMA, NOXA und BAX bewirken. Eine Inhibierung der microRNAs führte hingegen zu höheren p53- und PUMA-Expressionsspiegeln. Die microRNAs haben damit eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Prozessen wie Apoptose, Zellzyklusarrest und zellulärer Seneszenz inne. Die Autoren postulierten, dass die p53-Inaktivierung durch eine microRNA-Überexpression vermutlich ein früher Schritt bei der Entartung der Plasmazellen auf dem Weg zum manifesten Multiplen Myelom ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Erkenntnis, dass Myelom-Patienten mit niedrigerer Expression der Ribonuklease Dicer, die eine wichtige Rolle in der microRNA-Biogenese spielt, im Schnitt ein längeres progressionsfreies Überleben zeigen. (Kumar et al. 2011)

In späteren Studien konnten weitere microRNAs identifiziert werden, die p53 über die 3'-UTR seiner mRNA regulieren und ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren: miR-504, miR-380-5p, miR-141, miR-1285, miR-200a und miR-15a. In diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen wurde das p53-Gen anschließend

auf Mutationen analysiert, die die 3'-UTR seiner mRNA betreffen und so möglicherweise die Bindung der microRNAs beeinflussen können. Überraschenderweise traten Mutationen in diesem Bereich mit weitaus höherer Frequenz auf, als in den codierenden Abschnitten des Gens, die in der Routinediagnostik regelmäßig untersucht werden. Betraf eine Mutation unmittelbar eine microRNA-Bindungsstelle, war die Suppression der p53-Expression durch die entsprechende microRNA nicht mehr möglich. Da diese Konstellation zu einer vermehrten Produktion von Tumorsuppressormolekülen führt und somit das Tumorwachstum eher behindert wird, gehen die Verfasser der Studie von einer Art „Selbstschutzmechanismus“ während der klonalen B-Zellexpansion aus, der vor einer malignen Entartung bewahren soll. (Deng et al. 2014)

Für verschiedene microRNAs, die mit p53 interagieren, ist eine Überexpression in weiteren Tumorentitäten nachgewiesen worden, unter anderem in Pankreas-, Prostata- oder Magenkarzinomen (Volinia et al. 2006).

Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass eine Überexpression dieser microRNAs auch in primären Lungentumoren vorliegen könnte und – beispielsweise im Rahmen eines Feedback-Mechanismus – Unterschiede der Expressionsmuster im Hinblick auf den p53-Mutationsstatus bestehen.

6.4 microRNA-Expressionsunterschiede in primären Lungentumoren

Signifikante Expressionsunterschiede von microRNAs zwischen Normal- und Lungenkarzinomgewebe wurden bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben (Osada und Takahashi 2011, Zhang et al. 2014). Die Ribonukleinsäuren können dabei auf unterschiedlichste Art und Weise an der Onkogenese beteiligt sein – sowohl als Tumoraktivatoren, als auch als Tumorsuppressoren. Für die vorliegende Arbeit sollten hingegen potentielle Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Bronchialkarzinomen untersucht werden. Die Mutationsanalysen der Gewebeproben mittels PCR und Sanger-Sequenzierung erbrachte für 11 der 29 Lungentumoren Mutationen des p53-Gens. In der Mehrzahl handelte es sich dabei um typische Missense-Mutationen des Tumorsuppressors, wodurch ein Codon der mRNA

dergestalt verändert wird, dass es zum Einbau einer anderen Aminosäure in das resultierende Protein kommt. Vier dieser Mutationen betrafen besonders häufig veränderte „Hotspot“-Bereiche des Gens, für zwei Mutationen sind in der Literatur „gain-of-function“-Charakteristika des mutierten Genproduktes beschrieben.

Die Expressionsanalyse mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR erbrachte die deutlichsten Expressionsunterschiede zwischen mutierter und nicht-mutierter Tumorgruppe für die microRNAs hsa-miR-200a-3p und hsa-miR-15a-3p. Statistisch signifikant waren die Ergebnisse jedoch nicht. Interessant ist die Tatsache, dass sich die erhobenen Daten grundsätzlich von den Expressionsmustern der Zellkulturgruppen unterscheiden und teilweise gegensätzliche Ergebnisse liefern. So weist die microRNA hsa-miR-200a-3p beispielsweise nahezu keine Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und Mutantengruppe im Zellkulturmodell auf. Neben den nachfolgend diskutierten Gründen ist hierbei auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass Ergebnisse aus Zellkulturversuchen nicht zwangsläufig auf die Verhältnisse in soliden Tumoren übertragbar sind. Da Tumorzelllinien üblicherweise aus Primärtumoren niedriger Differenzierung bzw. fortgeschrittenen Stadiums abgeleitet werden, repräsentieren sie ein besonders aggressives Verhalten und beinhalten lediglich hochgradige und schlecht differenzierte Tumorzellen. Im Organismus stellen Tumoren jedoch heterogene Strukturen dar, mit parallel vorhandenen niedriger und höher differenzierten Tumorgewebeanteilen.

6.5 Mögliche Gründe für Diskrepanzen zu anderen Publikationen

Trotz einiger interessanter Ansatzpunkte konnten statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der microRNA-Expression zwischen p53-mutierter und nicht-mutierter Gruppe im Rahmen dieser Arbeit weder im Zellkulturmodell, noch in primären Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden. Auch bei der Analyse der Expression von p53 bzw. seiner Zielgene p21, PUMA, NOXA und BAX ergaben sich keine statistisch signifikanten Abweichungen. Diese Daten unterscheiden sich zum Teil stark von den Ergebnissen anderer Studien, die möglichen Gründe hierfür werden im Folgenden dargelegt:

Ein entscheidender Punkt ist die Größe der jeweiligen Stichproben. Durch die Vorgabe, lediglich 29 Patientenproben zu betrachten, macht eine einzelne Probe bereits rund 3,4 % des Kollektivs aus, für die Zellkulturversuche ergibt sich bei 8 untersuchten Zelllinien gar ein Anteil von 12,5 %. Auf der Grundlage dieser Stichprobenumfänge signifikante Expressionsunterschiede festzustellen, ist eher als schwierig zu beurteilen.

Zudem ist die fehlende statistische Signifikanz der Untersuchungsergebnisse nicht automatisch mit der Aussage gleichzusetzen, dass keine microRNA-Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Zelllinien bzw. Tumorproben bestehen. Mit dem Ausdruck $p < 0,05$ wird angegeben, dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine Ungleichheit rein zufällig zustande kommt, höchstens 5 % beträgt. Es handelt sich um eine willkürlich festgelegte, dennoch allgemein akzeptierte Norm. Gleichzeitig bleibt die Möglichkeit, einen tatsächlich und nicht zufällig vorhandenen Unterschied zu übersehen (Fehler zweiter Art). Die Wahrscheinlichkeit, einen solchen Zusammenhang fälschlicherweise abzulehnen, hängt dabei unter anderem von der Anzahl der untersuchten Proben bzw. Patienten ab. Vor diesem Hintergrund kommt der Größe des Stichprobenumfangs nochmals eine besondere Bedeutung zu.

Eine weitere Ursache kann mit der Verwendung paraffineingebetteter Tumorproben aus dem Archiv des Instituts für Pathologie begründet werden. MicroRNAs weisen zwar generell eine weitaus höhere Stabilität als längere Ribonukleinsäuren auf und sind unter anderem resistent gegenüber hohen Temperaturen, pH-Wertschwankungen und Veränderungen in Folge einer Formalinfixierung und Paraffineinbettung. Dennoch ist ein gewisses Maß an Degradation, insbesondere im Hinblick auf die lange Lagerungszeit, nicht auszuschließen. Hilfreich wäre daher zum Beispiel die Wiederholung der Expressionsanalysen an frischen, gefrorenen Gewebeproben, da eine Degradation der Ribonukleinsäuren hier in geringerem Maße auftritt und sich möglicherweise andere Expressionsergebnisse zeigen. (Kakimoto et al. 2016)

Auch die verwendeten microRNA-Primer können ursächlich für abweichende Ergebnisse sein. Wie bereits an anderer Stelle dargelegt, erfolgt im Rahmen der microRNA-Biogenese die Synthese einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure, von der

entweder beide oder lediglich einer der Stränge die reife und funktionelle microRNA bilden kann. Der sogenannte 5p-Strang repräsentiert die Forward-Richtung (5' zu 3'), der dazu komplementäre 3p-Strang die Reverse-Sequenz. Beide Stränge können Unterschiede bezüglich der Stabilität und Funktion aufweisen. Häufig ist aus einer Publikation nicht ersichtlich, ob für die jeweilige Studie der 5p- oder 3p-Primer verwendet wurde, sodass in der vorliegenden Arbeit eventuell der gegenläufige Strang untersucht wurde und die Ergebnisse daher nicht deckungsgleich sind.

Eine weitere Erklärung liegt möglicherweise in der Ausführung der p53-Mutationsanalysen begründet. Für die vorliegende Arbeit wurden lediglich die codierenden Exone 5 bis 8 des Tumorsuppressorgens untersucht. In einer Studie durch Vijayakumaran et al. aus dem Jahr 2015 wird jedoch beschrieben, dass p53-regulierende microRNAs nicht zwischen Wildtyp-Form und Mutante unterscheiden können, es sei denn, die Mutation betrifft eine der Bindungsstellen der microRNAs (Vijayakumaran et al. 2015). Die gezielte Analyse der 3'-UTR des p53-Gens, die den Hauptangriffspunkt der nichtcodierenden Ribonukleinsäuren bildet, könnte in Kombination mit Expressionsanalysen signifikante Unterschiede der microRNA-Expression zwischen Wildtyp- und Mutanten-Gruppe aufdecken bzw. Unterschiede in der p53-Expression aufgrund einer Herabregulierung in der Wildtyp-Gruppe gegenüber der Mutante feststellen.

Auch die Tatsache, dass für die Betrachtung der Expressionsunterschiede die Tumorentität infolge des geringen Stichprobenumfangs außer Acht gelassen wurde, könnte Auswirkungen auf das Ergebnis gehabt haben. Für einige microRNAs sind beispielsweise bereits Expressionsunterschiede zwischen Adenokarzinomen und kleinzelligen Tumoren der Lunge nachgewiesen worden (Yanaihara et al. 2006, Lebanony et al. 2009 und Landi et al. 2010). Möglicherweise ergeben sich zum Beispiel bei der Betrachtung eines größeren Patientenkollektivs, das nicht nur unter dem Gesichtspunkt des p53-Mutationsstatus sondern gleichzeitig auch nach vorliegender Tumorentität bewertet wird, relevante Expressionsunterschiede mit diagnostischer Bedeutung.

Zudem könnte eine gewebespezifische Expression der microRNAs die Ergebnisse beeinflusst haben. Für die Auswahl der nichtcodierenden Ribonukleinsäuren, die in die vorliegende Arbeit einbezogen werden sollten, wurden vorrangig Literaturrecherchen

durchgeführt. Der Fokus lag dabei auf microRNAs, für die bereits eine Interaktion mit dem Tumorsuppressorgen p53 belegt oder beschrieben worden ist. Ob diese Interaktion in primären Lungentumoren oder Lungenkarzinomzelllinien untersucht wurde, war dabei zunächst zweitrangig. Da microRNAs gewebeabhängige Expressionsmuster und Funktionen aufweisen, können unterschiedliche Ergebnisse für ein und dieselbe microRNA zustande kommen.

Interessante Resultate hätte auch eine Untersuchung der p53-Expression und p53-Zielgenexpression in den Tumorgewebeproben erbringen können. Aufgrund der starken Degradierung und Veränderung der Ribonukleinsäuren infolge der Fixierung und Paraffineinbettung waren Expressionsanalysen von p53, p21, PUMA, NOXA und BAX nicht möglich.

6.6 Offene Fragen und Ausblick

Auch wenn bereits zahlreiche vielversprechende Studien bezüglich der biologischen und klinisch-praktischen Bedeutung der microRNAs publiziert worden sind, steht die Erforschung dieser nichtcodierenden Ribonukleinsäuren noch am Anfang. Die enorme Anzahl von microRNAs im menschlichen Organismus und die hohe Bandbreite der durch sie regulierten Prozesse bieten unzählige Forschungsansätze. So ergeben sich auch auf der Grundlage dieser Arbeit weitere Fragestellungen, die im Rahmen zukünftiger Projekte behandelt werden könnten.

Beispielsweise ist eine Neubewertung der erhobenen Daten vor dem Hintergrund einer p53-Mutationsanalyse denkbar, die sich nicht auf die codierenden Abschnitte des Gens beschränkt, sondern die Bereiche umfasst, die für die 3'-untranslatierte Region der mRNA codiert. Da der Angriffspunkt der p53-regulierenden microRNAs in diesem Bereich liegt, können sich in Folge eines Feedback-Mechanismus signifikante Expressionsunterschiede zwischen mutierten und nicht-mutierten Tumorproben ergeben.

MicroRNAs sind zudem in der Lage, die p53-Proteinstabilität auch indirekt über seine Schlüsselregulatoren zu beeinflussen. Informativ kann daher die Untersuchung der p53-Regulatoren, beispielsweise des MDM2-Gens sein. So sind bereits einige

microRNAs beschrieben worden, die eine Degradation von MDM2 bewirken. Die MDM2-vermittelte Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau von p53 kann dadurch nicht mehr stattfinden, die p53-Spiegel steigen. (Jones und Lal 2012, Vijayakumaran et al. 2015 und Donzelli et al. 2012).

Durch verschiedene Studien ist bereits nachgewiesen worden, dass signifikante Unterschiede der microRNA-Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe bestehen. Die nichtcodierenden Ribonukleinsäuren zeigen dabei tendenziell eine Unterexpression im Tumorgewebe, allerdings sind ebenso einige überexprimierte microRNAs beschrieben worden (Lu et al. 2005). MicroRNAs können daher beispielsweise für die Frühdiagnostik von Tumoren eingesetzt werden. Eine Studie aus dem Jahr 2012 widmete sich der Untersuchung dieser Fragestellung für das Lungenkarzinom. Dabei wurden sowohl signifikante Über- als auch Unterexpressionen verschiedener microRNAs im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt (Guan et al. 2012). Ein Vergleich der Expression der 11 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten microRNAs zwischen Tumor- und Normalgewebe kann ebenfalls aufschlussreich sein und das Spektrum der microRNAs mit diagnostischer Relevanz für das Lungenkarzinom erweitern. Über die Entwicklung charakteristischer microRNA-Expressionsprofile erhofft man sich unter anderem eine Vereinfachung der genauen Klassifikation schlecht differenzierter Tumoren.

Auch die Bedeutung der microRNAs als Biomarker in der Tumordiagnostik ist bereits in mehreren Studien dargelegt worden. Aufgrund ihrer hohen Stabilität und der weitgehenden Resistenz gegenüber einem enzymbedingten Abbau in Körperflüssigkeiten sind sie für diesen Einsatz geradezu prädestiniert (Chen et al. 2008). Für die definitive präoperative Diagnose computertomografisch nachgewiesener Rundherde der Lunge konnten sich beispielsweise die microRNAs miR-21, miR-210 und miR-486-5p als potentielle frei zirkulierende Biomarker qualifizieren (Shen et al. 2011).

Schließlich ergibt sich mit der Entwicklung microRNA-basierter Therapieverfahren der jüngste Zweig der Erforschung nichtcodierender Ribonukleinsäuren. Für die Tumorthherapie sind hier bereits aufschlussreiche Publikationen veröffentlicht worden. Mit MRX34, einem miR-34-Analogen, wurde das erste microRNA-basierte Medikament zur Behandlung des fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinoms

entwickelt. Präklinische Studien konnten eine Reduktion des Tumorwachstums und Verbesserung des Überlebens im Mausmodell nachweisen. (Ling et al. 2013) Möglicherweise ergibt sich in Zukunft auch für das Lungenkarzinom in diesem Bereich ein vielversprechender neuer Therapieansatz.

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Mithilfe der vorliegenden experimentellen Arbeit ist die Interaktion zwischen 11 ausgewählten microRNAs und dem Tumorsuppressorgen p53 in Lungentumorzelllinien und primären Bronchialkarzinomen untersucht worden. Die PCR-gestützte microRNA-Expressionsanalyse ergab weder für das Zellkulturmodell, noch für die paraffineingebetteten Tumorproben statistisch signifikante Expressionsunterschiede zwischen p53-mutierten und nicht-mutierten Gruppen. Auch die Untersuchung der p53-Expression und p53-Zielgenexpression an Lungenkarzinomzelllinien deckte keine signifikanten Abweichungen zwischen Wildtyp- und Mutanten-Gruppe auf. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen ableiten.

Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die Regulation der Expression der untersuchten microRNAs in Lungentumorzelllinien und primären Lungenkarzinomen durch p53 unabhängig von dessen Mutationsstatus ist. Zur Validierung der Ergebnisse wäre eine Wiederholung der Untersuchungen mit größerem Stichprobenumfang unter Verwendung frischer, gefrorener Gewebeproben aufschlussreich.

Andererseits kann die Hypothese einer mutationsabhängigen Beeinflussung der Expression der microRNAs durch p53 nicht sicher verworfen werden, insbesondere im Hinblick auf zum Teil abweichende Resultate verschiedener Publikationen. Die bereits zuvor diskutierten möglichen Folgeexperimente können hier genauere Erkenntnisse liefern.

Eine unterschiedliche Beeinflussung des Tumorsuppressorgens p53 je nach Mutationsstatus erscheint in Anbetracht der Ergebnisse unwahrscheinlich. Da microRNAs ihre Wirkung jedoch über die Bindung an den 3'-untranslatierten Bereich der mRNA entfalten, sollte eine gezielte Mutationsanalyse dieser Region des p53-Gens ergänzt werden. Möglicherweise lassen sich so Unterschiede der p53- und p53-Zielgenexpression zwischen mutierten und nicht-mutierten Proben feststellen.

Zudem erfordert die Entwicklung charakteristischer microRNA-Expressionsmuster zu diagnostischen Zwecken eine differenziertere Betrachtung der Expressionslevel je nach vorliegender Tumorentität. Die gezielte Untersuchung eines größeren

Patientenkollektivs und die Aufschlüsselung der Expressionsergebnisse sowohl nach Tumortyp als auch nach Mutationsstatus könnte hier ausschlaggebend sein.

Die Arbeit bietet durch die aufgeworfenen Fragen interessante Anknüpfungspunkte für fortführende Untersuchungen und eine Vielzahl neuer Forschungsansätze, die im Rahmen künftiger Studien bearbeitet werden können.

LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** 2014. *Essential Cell Biology*. Vierte Aufl. New York, Abingdon: Garland Science, Taylor & Francis Group, 282-283
- Bartel DP.** 2004. *MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function*. Cell, 116(2):281-297
- Berufskrankheiten-Verordnung** vom 31. Oktober 1997 (BGBl. I S. 2623), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 10. Juli 2017 (BGBl. I S. 2299)
- Brosh R, Rotter V.** 2009. *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. Nature Reviews Cancer, 9(10):701-713
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Adler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM.** 2002. *Frequent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99(24):15524-15529
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY.** 2008. *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Research, 18(10):997-1006
- Cheng L, Alexander RE, MacLennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, Cramer HM, Davidson DD, Zhang S.** 2012. *Molecular Pathology of lung cancer: key to personalized medicine*. Modern Pathology, 25(3):347-369
- Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE.** 2006. *The colorectal microRNAome*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 103(10):3687-3692
- Deng G, Sui G.** 2013. *Noncoding RNA in Oncogenesis: A New Era of Identifying Key Players*. International Journal of Molecular Sciences, 14(9):18319-18349
- Deng Q, Becker L, Ma X, Zhong X, Young K, Ramos K, Li Y.** 2014. *The dichotomy of p53 regulation by noncoding RNAs*. Journal of Molecular Cell Biology, 6(3):198-205
- Dhom G.** 2001. *Geschichte der Histopathologie*. Erste Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- Donzelli S, Fontemaggi G, Fazi F, Di Agostino S, Padula F, Biagioni F, Muti P, Strano S, Blandino G.** 2012. *MicroRNA-128-2 targets the transcriptional repressor E2F5 enhancing mutant p53 gain of function.* Cell Death and Differentiation, 19(6):1038-1048
- Dubbink HJ, Deans ZC, Tops BBJ, van Kemenade FJ, Koljenović S, van Krieken HJM, Blokx WAM, Dinjens WNM, Groenen PJTA.** 2014. *Next generation diagnostic molecular pathology: Critical appraisal of quality assurance in Europe.* Molecular Oncology, 8(4):830-839
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.** 2013. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Verfügbar unter: <http://globocan.iarc.fr> (Abgerufen am 08.11.2017)
- Früh M, De Ruyscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E.** 2013. *Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practical Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Annals of Oncology, 24(6):99-105
- Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lübke AS, Reinhold T, Späth-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeböller H, Böcking A, Bohle RM, Brüske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gütz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heußel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hübner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Müller KM, Müller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rübe C, Schmittel A, Schönfeld N, Schütte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H.** 2010. *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms.* Pneumologie: 64(S02):e1-e164
- Goldstein I, Marcel V, Olivier M, Oren M, Rotter V, Hainaut P.** 2011. *Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies.* Cancer Gene Therapy, 18(1):2-11
- Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B.** 2012. *Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues.* Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 31(54):1-8
- Hanahan D, Weinberg RA.** 2011. *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 144(5):646-674

- Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA.** 2003. *DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer.* European Urology, 44(1):8-15
- Hu W, Chan CS, Wu R, Zhang C, Sun Y, Song JS, Tang LH, Levine AJ, Feng Z.** 2010. *Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504.* Molecular Cell, 38(5):689-699
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM.** 2005. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer.* Cancer Research, 65(16):7065-7070
- Jing J, Xiong S, Li Z, Wu J, Zhou L, Gui JF, Mei J.** 2015. *A feedback regulatory loop involving p53/miR-200 and growth hormone endocrine axis controls embryo size of zebrafish.* Scientific Reports, 5(15906):1-12
- Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF 3rd, Gaudreault J, Damico LA, Holmgren E, Kabbinavar F.** 2004. *Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer.* Journal of Clinical Oncology, 1;22(11):2184-2191
- Jones MF, Lal A.** 2012. *MicroRNAs, wild-type and mutant p53.* RNA Biology, 9(6):781-791
- Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Ochiai E, Osawa M.** 2016. *MicroRNA Stability in FFPE Tissue Samples: Dependence on GC Content.* PLoS ONE, 11(9):1-13
- Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon YJ, Volinia S, Pineau P, Marchio A, Palatini J, Suh SS, Alder H, Liu CG, Dejean A, Croce CM.** 2011. *p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2.* Journal of Experimental Medicine, 208(5):875-883
- Kruse JP, Gu W.** 2009. *Modes of p53 Regulation.* Cell, 137(4):609-622
- Kumar M, Lu Z, Takwi AAL, Chen W, Callander NS, Ramos KS, Young KH, Li Y.** 2011. *Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs.* Oncogene, 30(7):843-853
- Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, Rubagotti M, Goldstein AM, Linnoila I, Marincola FM, Tucker MA, Bertazzi PA, Pesatori AC, Caporaso NE, McShane LM, Wang E.** 2010. *MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer.* Clinical Cancer Research, 16(2):430-441

- Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, Gefen N, Izraeli S, Rechavi G, Pass H, Nonaka D, Li J, Spector Y, Rosenfeld N, Chajut A, Cohen D, Aharonov R, Mansukhani M.** 2009. *Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma.* Journal of Clinical Oncology, 27(12):2030-2037
- Levine AJ, Oren M.** 2009. *The first 30 years of p53: growing ever more complex.* Nature Reviews Cancer, 9(10):749-758
- Ling H, Fabbri M, Calin GA.** 2013. *MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development.* Nature Reviews Drug Discovery, 12(11):847-865
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR.** 2005. *MicroRNA expression profiles classify human cancers.* Nature, 435(7043):834-838
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Tewari M.** 2008. *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 105(30):10513-10518
- Muller PAJ, Vousden KH.** 2014. *Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities.* Cancer Cell, 25(3):304-317
- Muller PAJ, Vousden KH.** 2012. *P53 mutations in cancer.* Nature Cell Biology, 15(1):2-8
- Osada H, Takahashi T.** 2011. *Let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development.* Cancer Science, 102(1):9-17
- Osada H, Takahashi T.** 2002. *Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer.* Oncogene, 21(48):7421-7434
- Otsuka K, Ochiya T.** 2014. *Genetic Networks Lead and Follow Tumor Development: MicroRNA Regulation of Cell Cycle and Apoptosis in the p53 Pathways.* BioMed Research International, 2014(749724):1-10
- Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson DM Jr, Hofmainster C, Alder H, Garofalo M, Di Leva G, Volinia S, Lin HJ, Perrotti D, Kuehl M, Ageilan RI, Palumbo A, Croce CM.** 2010. *Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194 and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development.* Cancer Cell, 18(4):367-381

- Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V.** 2011. *Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis.* Genes Cancer, 2(4):466-474
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Jung K.** 2010. *Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma.* International Journal of Cancer, 126(5):1166-1176
- Shen J, Liu Z, Todd NW, Zhang H, Liao J, Yu L, Guarnera MA, Li R, Cai L, Zhan M, Jiang F.** 2011. *Diagnosis of lung cancer individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers.* BMC Cancer, 11(374):1-9
- Suh SS, Yoo JY, Nuovo GJ, Jeon YJ, Kim S, Lee TJ, Kim T, Bakacs A, Alder H, Kaur B, Aqeilan RI, Pichiorri F, Croce CM.** 2012. *MicroRNAs/TP53 feedback circuitry in glioblastoma multiforme.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(14):5316-5321
- Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K.** 2009. *Modulation of microRNA processing by p53.* Nature, 460(7254):529-533
- Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, Balakrishnan A, Phua Y, Nguyen A, Chanthery Y, Lim L, Ashton LJ, Judson RL, Huskey N, Blelloch R, Haber M, Norris MD, Lengyel P, Hackett CS, Preiss T, Chetcuti A, Sullivan CS, Marcusson EG, Weiss W, L'Etoile N, Goga A.** 2010. *miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma.* Nature Medicine, 16(10):1134-1140
- Takwi A, Li Y.** 2009. *The p53 Pathway Encounters the MicroRNA World.* Current Genomics, 10(3):194-197
- Tian S, Huang S, Wu S, Guo W, Li J, He X.** 2010. *MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 396(2):435-439
- Travis WD.** 2011. *Pathology of Lung Cancer.* Clinics in Chest Medicine, 32(4):669-692
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG.** 2015. *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.* Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Vijayakumaran R, Tan KH, Miranda J, Haupt S, Haupt Y.** 2015. *Regulation of Mutant p53 Protein Expression.* Frontiers in Oncology, 5(284):1-8
- Virchow R.** 1847. *Ueber die Reform der pathologischen und therapeutischen Anschauungen durch die mikroskopischen Untersuchungen.* In: Virchow R, Reinhardt B, Hrsg. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin. Erste Aufl. Berlin: Druck und Verlag von G. Reimer, 255

- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM.** 2006. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(7):2257-2261
- Walsh K, Wallace WA.** 2014. *Molecular pathology in lung cancer: a guide to the techniques used in clinical practice*. Histopathology, 65(6):731-741
- Wang X, Chen JX, Liu JP, You C, Liu YH, Mao Q.** 2014. *Gain of function of mutant TP53 in glioblastoma: prognosis and response to temozolomide*. Annals of Surgical Oncology, 21(4): 1337-1344
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC.** 2006. *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 9(3):189-198
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut, Hrsg.** 2016. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland*. Berlin: Robert-Koch-Institut.
- Zhang L, Volinia S, Bonome T, Calin GA, Greshock J, Yang N, Liu CG, Giannakakis A, Alexiou P, Hasegawa K, Johnstone CN, Megraw MS, Adams S, Lassus H, Huang J, Kaur S, Liang S, Sethupathy P, Leminen A, Simossis VA, Sandaltzopoulos R, Naomoto Y, Katsaros D, Gimotty PA, DeMichele A, Huang Q, Bützow R, Rustgi AK, Weber BL, Birrer MJ, Hatzigeorgiou AG, Croce CM, Coukos G.** 2008. *Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(19):7004-7009
- Zhang Y, Yang Q, Wang S.** 2014. *MicroRNAs: a new key in lung cancer*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 74(6):1105-1111

ANHANG

Ethikvotum



Ethik-Kommission

Universitätsklinikum Jena · Ethik-Kommission · 07740 Jena

PD Dr. med. Yuan Chen
 Institut für Pathologie
 Ziegelmühlenweg 1
 UKJ
 07740 Jena

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Ulrich Brandl
 Geschäftsstelle: Dr. phil. Ulrike Skorsetz

Bachstraße 18
 07743 Jena

Telefon 03641 93 37 70
 Telefax 03641 93 37 71

E-Mail: ethikkommission@med.uni-jena.de

13. September 2017

Bearbeitungs-Nr.: 5260-08/17

Sehr geehrte Frau Dr. Chen,

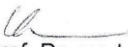
die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller Universität Ihren Antrag

miRNA- Expression- und Mutationsanalyse von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen in Lungenkarzinom

beraten und erhebt gegen das Projekt keine ethischen oder berufsrechtlichen Bedenken.

Bitte reichen Sie die Unterschriftenseite mit der Unterschrift der Institutsdirektorin nach.

Mit kollegialem Gruß


 Prof. Dr. med. M. von Lilienfeld-Toal
 Stellv. Vorsitzende der Ethik-Kommission

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00
 Internet: www.uniklinikum-jena.de
 Gerichtsstand Jena
 USt-IdNr. DE 150545777
 Bankverbindung: Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30
 Konto 221 IBAN: DE97 8305 3030 0000 0002 21
 BIC: HELADEF1JEN

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des Öffentlichen Rechts
 als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena
 Verwaltungsratsvorsitzender: Staatssekretär Markus Hoppe
 Kaufmännischer Vorstand und Sprecherin des
 Klinikumsvorstandes: Dr. Brunhilde Seidel-Kwem
 Medizinischer Vorstand: PD Dr. Jens Maschmann
 Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf



Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über eingesetztes Laborequipment und Verbrauchsmaterial
Tabelle 2:	Übersicht zu verwendeten Chemikalien und Zellkulturreagenzien
Tabelle 3:	Sequenzen der eingesetzten PCR-Primer
Tabelle 4:	Eingesetzte Kits bzw. Assays
Tabelle 5:	Zusammensetzung der verwendeten Puffer bzw. Lösungen
Tabelle 6:	Überblick über verwendete Zelllinien
Tabelle 7:	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription
Tabelle 8:	miScript Primer Assays
Tabelle 9:	Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR
Tabelle 10:	qPCR-Reaktionsansatz
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für die PCR
Tabelle 12:	microRNA-Expressionsmuster in Lungenkarzinomzelllinien
Tabelle 13:	p53-Expression und p53-Zielgenexpression an Lungenkarzinomzelllinien
Tabelle 14:	Ergebnis der p53-Mutationsanalysen der positiv getesteten (mutierten) Fälle
Tabelle 15:	microRNA-Expressionsmuster in primären Lungentumoren

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Akkumulation genetischer Veränderungen im Verlauf der Tumorentstehung
- Abbildung 2:** Adenokarzinom
- Abbildung 3:** Plattenepithelkarzinom
- Abbildung 4:** p53-Funktion und Zielgenregulation
- Abbildung 5:** microRNA-Biogenese und Wirkungsprinzip
- Abbildung 6:** Versuchsablauf
- Abbildung 7:** Ablauf der Reversen Transkription
- Abbildung 8:** microRNA-Expressionsprofile in Lungenkarzinomzelllinien
- Abbildung 9:** p53-Expression und p53-Zielgenexpression in Zelllinien
- Abbildung 10:** Ergebnis der p53-Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung der glandulär differenzierten Tumorproben (Adenokarzinome)
- Abbildung 11:** Ergebnis der p53-Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung der Plattenepithelkarzinome
- Abbildung 12:** Ergebnis der p53-Mutationsanalysen mittels Sanger-Sequenzierung der Plattenepithelkarzinome
- Abbildung 13:** microRNA-Expressionsprofile in primären Lungentumoren

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Yuan Chen, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers